

Rosmarinsäure-Biosynthese in Suspensionskulturen von *Melissa officinalis* L.

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Corinna Weitzel
aus Marburg**

Marburg/Lahn 2009

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 25. November 2009 angenommen.

Erstgutachterin: Prof. Dr. M. Petersen

Zweitgutachter: Prof. Dr. U. Matern

Tag der mündlichen Prüfung am 26. November 2009

In minimis deus maximus
(Augustinus)

Im Kleinen ist Gott der Größte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Sekundärstoff-Produktion in Pflanzenzellkulturen	1
1.2	Rosmarinsäure	4
1.2.1	Entdeckung, Struktur und Verbreitung im Pflanzenreich	4
1.2.2	Pharmakologische Wirkungen und Bedeutung als Sekundärstoff	5
1.2.3	Biosynthese	6
1.2.4	Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)	8
1.2.5	Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H)	9
1.2.6	Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL)	11
1.2.7	Tyrosin Aminotransferase (TAT)	12
1.2.8	Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR)	15
1.2.9	Rosmarinsäure Synthase (RAS)	17
1.2.10	3- und 3'-Hydroxylasen	19
1.3	Zitronenmelisse (<i>Melissa officinalis</i> L.)	20
1.4	Ziele dieser Arbeit	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Pflanzenmaterial	24
2.1.1	Suspensionskulturen von <i>Melissa officinalis</i>	24
2.1.2	Kulturmedien	24
2.2	Charakterisierung einer Suspensionskultur von <i>Melissa officinalis</i>	26
2.2.1	Steriles Animpfen der Kulturen	26
2.2.2	Bestimmung von Wachstumsparametern	26
2.2.3	Bestimmung von Mediumsparametern	26
2.2.4	Bestimmung des Rosmarinsäure-Gehalts	27
2.2.4.1	Extraktion	27
2.2.4.2	HPLC-Analytik	27
2.2.5	Semiquantitative PCR	27
2.3	Allgemeine Methoden	30
2.3.1	Herstellen eines Proteinrohextraktes	30
2.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes	30
2.3.3	Tests zur Bestimmung der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)-Aktivität	31
2.3.3.1	Bestimmung der Enzymaktivität mithilfe eines Photometers	31
2.3.3.2	Bestimmung der Enzymaktivität durch HPLC	32
2.3.4	Bestimmung der Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H)-Aktivität	32
2.3.4.1	Isolierung der Mikrosomen	32
2.3.4.2	Bestimmung der C4H-Enzymaktivität	33
2.3.5	Standardtest zur Bestimmung der Hydroxyzimtsäure: CoA-Ligase (4CL)-Aktivität	33
2.3.6	Bestimmung der Tyrosin Aminotransferase (TAT)-Aktivität	34
2.3.7	Standardtest zur Bestimmung der Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR)-Aktivität	35

2.3.8	Standardtest zur Bestimmung der Rosmarinsäure Synthase (RAS)-Aktivität	35
2.3.9	Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung	36
2.3.10	Synthese von Caffeoyl- und 4-Cumaroyl-CoA	36
2.3.10.1	Synthese von Caffeoyl- und 4-Cumaroyl-Succinimid-Estern	36
2.3.10.2	Synthese von Caffeoyl- und 4-Cumaroyl-CoA	37
2.3.11	Gewinnung von DHPL aus Rosmarinsäure	38
2.4	Methoden der Molekularbiologie	39
2.4.1	RNA-Isolierung	39
2.4.2	Agarose-Genelektrophorese	40
2.4.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
2.4.4	Synthese von cDNA mithilfe des „RevertAid® First Strand cDNA Synthese Kit“	41
2.4.5	Polymerase-Kettenreaktion	42
2.4.5.1	Amplifikation von DNA-Sequenzen	43
2.4.6	RACE-PCR	43
2.4.7	DNA-Extraktion aus einem Agarosegel	49
2.4.8	Ligation in den Vektor pGEM®-T	49
2.4.9	Medien für die Bakterienzucht	50
2.4.10	Transformation mit Roti®-Transform	50
2.4.10.1	Kompetente <i>E. coli</i>	50
2.4.10.2	Transformation	51
2.4.11	Anlegen von Bakteriendauerkulturen	52
2.4.12	Plasmid-Extraktion „Quick and Dirty“ nach Birnboim und Doly	52
2.4.13	Aufreinigung von Plasmiden mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN)	53
2.4.14	Restriktionsverdau	54
2.4.15	Sequenzierung von DNA-Amplifikaten	54
2.5	Klonierung der an der Biosynthese der Rosmarinsäure beteiligten Gene für PAL, 4CL und RAS	54
2.5.1	Klonierung der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)	54
2.5.2	Klonierung der Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL)	57
2.5.3	Klonierung der Rosmarinsäure Synthase (RAS)	61
2.5.4	Anzucht und Induktion rekombinanter Mikroorganismen	62
2.5.5	Gewinnung des Proteinrohextraktes aus Bakterien	63
2.5.6	Reinigung rekombinanter Proteine durch Affinitätschromatographie	64
2.5.7	SDS-PAGE	65
2.5.8	Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)	67
2.5.9	Aufklärung der genomischen Sequenzen von 4CL und PAL	67
2.6	Southern Blot-Analyse von 4CL, PAL und RAS	68
2.6.1	Isolierung genomischer DNA	69
2.6.2	Restriktionsverdau der genomischen DNA	70
2.6.3	Southern Blotting	70
2.6.4	Herstellen einer DIG-markierten-cDNA-Sonde	71
2.6.5	Detektion der markierten DNA	73
3	Ergebnis	75
3.1	Charakterisierung einer Suspensionskultur	75
3.1.1	Vorbemerkung	75
3.1.2	Einfluss des Saccharose-Gehaltes des Mediums auf die Rosmarinsäure-Akkumulation	75
3.1.2.1	Wachstumsparameter	75
3.1.2.2	Mediumsparameter	77

3.1.2.3	Rosmarinsäure-Gehalt	78
3.1.3	Elicitierung einer Suspensionskultur mit Methyljasmonat	79
3.1.3.1	Wachstumsparameter	79
3.1.3.2	Mediumsparameter	80
3.1.3.3	Rosmarinsäure-Gehalt	82
3.1.4	Charakterisierung einer in CB2-Medium kultivierten <i>Melissa officinalis</i> -Suspensionskultur	82
3.1.4.1	Wachstumsparameter	82
3.1.4.2	Mediumsparameter	84
3.1.4.3	Rosmarinsäure-Gehalt	84
3.1.4.4	Proteingehalt	85
3.1.4.5	Aktivität der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)	86
3.1.4.6	Aktivität der Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL) und mRNA-Expressionsprofil	87
3.1.4.7	Aktivität der Tyrosin Aminotransferase	89
3.1.4.8	Aktivität der Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR)	90
3.1.4.9	Aktivität der Rosmarinsäure Synthase (RAS) und mRNA-Expressionsprofil	91
3.2	Charakterisierung der an der Rosmarinsäure-Biosynthese beteiligten Enzyme aus Melissen-Suspensionskulturen	93
3.2.1	Charakterisierung der Phenylalanin Ammoniak-Lyase	93
3.2.1.1	Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration	93
3.2.1.2	Temperaturoptimum	94
3.2.1.3	pH- und Puffer-Optimum	94
3.2.1.4	K _m -Wert für L-Phenylalanin	95
3.2.2	Charakterisierung der Zimtsäure 4-Hydroxylase	95
3.2.2.1	Ermittlung der optimalen Reaktionszeit	95
3.2.2.2	Temperaturoptimum	96
3.2.2.3	pH- und Pufferoptimum	97
3.2.2.4	K _m -Wert für <i>t</i> -Zimtsäure	97
3.2.2.5	K _m -Wert für NADPH	98
3.2.3	Charakterisierung der Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase	99
3.2.3.1	Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration	100
3.2.3.2	Temperaturoptimum	100
3.2.3.3	pH-Optimum	101
3.2.3.4	K _m -Wert für Kaffeesäure	101
3.2.3.5	K _m -Wert für 4-Cumarsäure	102
3.2.3.6	K _m -Wert für ATP	102
3.2.3.7	K _m -Wert für Coenzym A	103
3.2.3.8	Anmerkung	103
3.2.4	Charakterisierung der Tyrosin Aminotransferase	104
3.2.4.1	Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration und Inkubationszeit	104
3.2.4.2	Temperaturoptimum	105
3.2.4.3	pH-Optimum	106
3.2.4.4	K _m -Wert für L-Tyrosin	106
3.2.4.5	K _m -Wert für 2-Oxoglutarat	107
3.2.5	Charakterisierung der Hydroxyphenylpyruvat Reduktase	109
3.2.5.1	Anreicherung der HPPR durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung	111
3.2.5.2	Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration und Inkubationszeit	111
3.2.5.3	Temperaturoptimum	112
3.2.5.4	pH-Optimum	113
3.2.5.5	K _m -Wert für 4-Hydroxyphenylpyruvat	114
3.2.5.6	K _m -Wert für 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat	115

3.2.5.7	K_m -Wert für NADH	116
3.2.5.8	K_m -Wert für NADPH	117
3.2.6	Charakterisierung der Rosmarinsäure Synthase	118
3.2.6.1	Ermittlung der optimalen Proteinkonzentration	119
3.2.6.2	Temperaturoptimum	120
3.2.6.3	pH-Optimum	120
3.2.6.4	K_m -Werte für Caffeoyle-CoA	120
3.2.6.5	K_m -Werte für 4-Cumaroyl-CoA	122
3.2.6.6	K_m -Werte für pHPL	124
3.2.6.7	K_m -Wert für DHPL	126
3.3	Klonierung der Phenylalanin Ammoniak-Lyase	128
3.3.1	Klonierung der PAL-cDNA	128
3.3.2	Sequenzvergleich der PAL	131
3.3.3	Phylogenetische Analyse der PAL	131
3.3.4	Reinigung der PAL durch Affinitätschromatographie	133
3.3.5	Charakterisierung der heterolog exprimierten PAL	134
3.3.5.1	Temperaturoptimum	134
3.3.5.2	pH- und Pufferoptimum	134
3.3.5.3	K_m -Wert für L-Phenylalanin	135
3.3.6	Aufklärung der genomischen Sequenz der PAL	136
3.3.7	Southern Blot-Analyse zur Ermittlung der Zahl der PAL-Gen-kopie	138
3.3.7.1	Herstellung einer DIG-markierten PAL-Sonde	139
3.3.7.2	Ergebnis des Southern Blot	141
3.4	Klonierung einer cDNA für eine 4-Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase	141
3.4.1	Klonierung der vollständigen 4CL-cDNA	142
3.4.2	Expression und Reinigung der 4CL durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie	143
3.4.3	Phylogenetische Analyse der 4CL	145
3.4.4	Charakterisierung der heterolog exprimierten 4CL	146
3.4.4.1	Substratspezifität	147
3.4.4.2	Ermittlung der optimalen Proteinkonzentration	147
3.4.4.3	Temperaturoptimum	147
3.4.4.4	pH- und Pufferoptimum	148
3.4.4.5	K_m -Wert für 4-Cumarsäure	149
3.4.4.6	K_m -Wert für Kaffeesäure	149
3.4.4.7	K_m -Wert für ATP	150
3.4.4.8	K_m -Wert für Coenzym A	152
3.4.5	Aufklärung der genomischen Sequenz der 4CL	154
3.4.6	Southern Blot-Analyse von Genkopien der 4CL	154
3.4.6.1	Herstellung einer DIG-markierten Sonde für 4CL	155
3.4.6.2	Ergebnis des Southern Blot	156
3.5	Klonierung der Rosmarinsäure Synthase	157
3.5.1	Klonierung der RAS-cDNA	157
3.5.2	Expression der rekombinanten RAS	158
3.5.3	Sequenzvergleich der RAS	160
3.5.4	Phylogenetische Analyse der RAS	161
3.5.5	Charakterisierung der heterolog exprimierten RAS	163
3.5.5.1	Substratspezifitäten	163
3.5.5.2	Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration	163
3.5.5.3	Temperaturoptimum	164
3.5.5.4	pH-Optimum	164
3.5.5.5	K_m -Wert für Caffeoyle-CoA	165
3.5.5.6	K_m -Wert für 4-Cumaroyl-CoA	166
3.5.5.7	K_m -Wert für pHPL	168

3.5.5.8	K _m -Wert für DHPL	170
3.5.6	Southern Blot-Analyse für Genkopien der Rosmarinsäure Synthase	172
3.5.6.1	DIG-markierte RAS-Sonde	172
3.5.6.2	Ergebnis des Southern Blot	173
4	Diskussion	174
4.1	Phenylalanin Ammoniak-Lyase	174
4.1.1	cDNA-Volllängensequenz und Proteinstruktur der Phenylalanin Ammoniak-Lyase	174
4.1.2	Charakterisierung der PAL	176
4.1.3	Auftreten von PAL-Genkopien	178
4.1.4	Genomische Sequenz der PAL	179
4.1.5	Expression der PAL	180
4.2	Zimtsäure 4-Hydroxylase	181
4.3	Hydroxyzimtsäure:Coenzym A-Ligase	182
4.3.1	cDNA-Volllängensequenz	182
4.3.2	Genomische Struktur der 4CL und Interpretation der Ergebnisse des Southern Blotting	185
4.3.3	Expression der 4CL	187
4.3.4	Substratspezifität der 4CL	187
4.3.5	Evolution der Hydroxyzimtsäure:Coenzym A-Ligase	189
4.4	Tyrosin Aminotransferase	191
4.4.1	Kinetische Parameter der TAT im Proteinrohextrakt aus Melissen-Suspensionskulturen	191
4.4.2	Expression der TAT und Beteiligung des Enzyms an der Rosmarinsäure-Biosynthese	192
4.4.3	Klonierung einer putativen TAT aus <i>Melissa officinalis</i>	193
4.5	Hydroxyphenylpyruvat Reduktase	196
4.5.1	Expression der HPPR	196
4.5.2	Charakterisierung der HPPR	196
4.5.3	Bedeutung der HPPR im Stoffwechsel der Pflanze	197
4.6	Rosmarinsäure Synthase	198
4.6.1	cDNA-Volllängensequenz	198
4.6.2	Charakterisierung der RAS	200
4.6.3	Expression der RAS	202
4.6.4	Hydroxycinnamoyltransferasen in Pflanzen: Funktion und Evolution	202
4.7	Rosmarinsäure-Biosynthese: Zusammenfassung und Ausblick	205
5	Zusammenfassung	209
6	Summary	211
7	Referenzen	213
8	Anhang	224
8.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	224
8.1.1	Chemikalien	224
8.1.2	Enzyme für molekularbiologische Arbeiten	226
8.1.3	Vektoren und Kits	226

8.1.4	Geräte	227
8.2	Abkürzungen	228
8.2.1	Abkürzungen im Text	228
8.2.2	Abkürzungen der Aminosäuren und Nukleotide	230
8.3	Vektorkarten	231
8.3.1	pGEM®-T Vektor	231
8.3.2	pRSET C Vektor	231
8.3.3	pET-15b Vektor	232
8.3.4	pQE70 Vektor	233
	Publikationen	234
	Danksagung	235
	Erklärung	236
	Lebenslauf	237

1 Einleitung

1.1 Sekundärstoff-Produktion in Pflanzenzellkulturen

Weil Zellkulturen bestimmte Naturstoffe in größeren Mengen akkumulieren können als die Elternpflanzen, gelten Pflanzenzellkulturen als ideale Möglichkeit, wertvolle Sekundärstoffe in großen Mengen zu produzieren (Razzaque und Ellis, 1977) oder ihre Biosynthese zu untersuchen (Alfermann und Petersen, 1995).

Als Beginn der Zellkultur-Biotechnologie wird Gottlieb Haberlandts Veröffentlichung zur Kultivierung isolierter Pflanzenzellen angesehen (Haberlandt, 1902). Schon damals war er davon überzeugt, dass jede Zelle prinzipiell omnipotent ist. In Ermangelung von Pflanzenhormonen gelang es ihm jedoch nicht, die isolierten Zellen weiter zu vermehren. Erst dreißig Jahre später war es verschiedenen Forschern gelungen, Zellkulturen anzulegen (Gautheret 1939, 1941; Nobécourt 1937). So beschreibt White 1939 das Anlegen einer Kalluskultur von *Nicotiana glauca* \times *Nicotiana langsdorffii* und deren Vermehrung auf künstlichem Nährmedium. Die kultivierten Zellen waren undifferenziert und zu potentiell unlimitedem Wachstum fähig. Schließlich wurde die „Kultivierung von Pflanzenzellen“ und ihre Verwendung zur Gewinnung nutzbringender Inhaltsstoffe in den USA unter Patent gestellt (Routien und Nickel, 1952; US Patent 2,747,334).

Gegenüber der Sammlung aus der Natur oder dem Anbau hat die Gewinnung von kommerziell interessanten Sekundärstoffen aus Pflanzenzellkulturen beispielsweise folgende Vorteile: Unabhängigkeit von geographischen, saisonalen und politischen Faktoren, Gewährleistung einer kontinuierlichen Versorgung mit Produkten gleichbleibender Qualität in kurzen Wachstumsperioden und die Möglichkeit, durch (genetische) Manipulation der Zellen auch solche Produkte zu gewinnen, die von Elternpflanzen nicht synthetisiert werden (Ramachandra Rao und Ravishankar, 2002). Zudem trägt die Verwendung von Pflanzenzellkulturen auch zum Umweltschutz bei, da die Artengefährdende Ernte von Pflanzen zur Gewinnung seltener und nur in geringen Mengen produzierter Sekundärstoffe verhindert werden kann (Alfermann und Petersen, 1995). Ein Beispiel für eine solche Artengefährdung durch Überernte ist die Pazifische Eibe (*Taxus brevifolia*, Taxaceae), aus deren Rinde Paclitaxel, ein Arzneistoff zur Behandlung von Brust- und Ovarialkarzinomen, isoliert werden kann.

Obwohl Pflanzenzellkulturen prinzipiell geeignete Systeme für die Biosynthese und Akkumulation pflanzlicher Produkte sind, konnten bis heute für nicht einmal eine Handvoll Sekundärmetabolite die kommerzielle Produktion in Zellkulturen etabliert werden. Nach Alfermann und Petersen kann dies folgende Ursache haben: Die meisten Stoffe mit

kommerziellem Interesse werden, wenn überhaupt, von undifferenzierten Zellkulturen lediglich in geringen Mengen produziert. Ausnahmen sind Shikonin in Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon* und Ginsenoside aus *Panax ginseng*. Selbst wenn ein Biosyntheseweg bekannt ist, bleibt oft unklar, welche Faktoren die Expression der beteiligten Gene beeinflussen. Außerdem muss untersucht werden, wie die entstandenen Produkte abgebaut oder wo sie in der Pflanze gelagert werden. Erst wenn alle diese Fragen geklärt sind, kann die Synthese des gewünschten Produktes gezielt optimiert werden.

Viele Pflanzen haben zur Biosynthese bestimmter Naturstoffe spezialisierte Zellen entwickelt. Ein Beispiel sind die Drüsenschuppen der Lippenblütler und Korbblütler, in denen das ätherische Öl gebildet und gesammelt wird. Zellkulturen ohne diese Drüsenzellen bilden oftmals gar kein ätherisches Öl, akkumulieren Vorläufer oder aber Stoffe, die in der Pflanze selbst nicht zu finden sind. So steigerte eine *Mentha piperita*-Kalluskultur, die Drüsenzellen ausgebildet hatte und ätherisches Öl synthetisierte, die Syntheserate des ätherischen Öls vorrangig durch die Bildung weiterer Drüsenzellen (Mulder-Krieger et al., 1988).

Sekundäre Pflanzenprodukte können allerdings nicht nur aus Zellkulturen, sondern alternativ auch aus Organkulturen gewonnen werden. Die zu diesem Zweck verwendeten Organtypen sind die sogenannten Hairy roots, untransformierte Wurzel- und Sprosskulturen (Bourgand et al., 2001).

Hairy roots werden nach erfolgreicher Transformation einer Pflanze mit *Agrobacterium rhizogenes* gebildet. Obwohl sie auf den ersten Blick eine große Ähnlichkeit mit gewöhnlichen Wurzeln aufweisen und diesen in ihrem Metabolismus praktisch entsprechen, sind sie gewöhnlich länger und zahlreicher sowie stärker verzweigt. *In vitro* sind sie in der Lage, auch ohne Phytohormone schnell zu wachsen und zeitgleich sekundäre Pflanzenmetabolite zu synthetisieren. Aufgrund ihrer hohen genetischen Stabilität bleibt diese Fähigkeit in den meisten Fällen über lange Kulturperioden erhalten (Veena und Taylor, 2007). Unter Lichteinstrahlung kultivierte Hairy roots entwickeln grüne Gewebe und können durch die Expression von Chloroplasten-Enzymen andere Biosynthesewege aufweisen als solche Hairy roots, die unter Lichtausschluss kultiviert wurden (Bourgand et al., 2001).

1974 untersuchte eine Arbeitsgruppe um Freeman die Biosynthese der charakteristischen Aromastoffe der Zwiebel in Kalluskulturen von *Allium cepa* L.. Dabei stellten sie fest, dass ein zur Bildung jener Stoffe benötigtes Enzym, die Alliinase, zwar durch undifferenzierte Zellen gebildet wird, die für die Aromastoffe erforderlichen Vorstufen jedoch in undifferenzierten Zellen fehlten. Nur Kulturen, die differenzierte Wurzeln ausgebildet hatten, waren auch zur Biosynthese der Vorläufer in der Lage. Eine ähnliche Beobachtung machten Yukumine et al. (1994), während sie die Produktion der Tropanalkaloide in Wurzelkulturen von *Duboisia myoporoides* untersuchten. Hierbei stellten sie fest, dass Tropanalkaloide wie Hyoscyamin und Scopolamin, die gewöhnlich in den Wurzeln der Solanaceen gebildet und schließlich in oberirdische Teile der Pflanze transportiert werden, auch *in vitro* nur in differenzierten Wurzelkulturen produziert werden.

Die Bildung von Sprosskulturen ist wie die Bildung von Wurzelkulturen transgen durch Infektion mit Agrobakterien möglich, kann jedoch auch nicht-transgen durch Behand-

lung mit bestimmten Pflanzenhormonen ausgelöst werden. Wie Hairy roots verfügen die Sprosskulturen über hohe genetische Stabilität und gute Kapazitäten zur Biosynthese pflanzlicher Sekundärmetabolite. Allerdings wachsen sie häufig langsamer als Wurzelkulturen und sind von Lichtexposition abhängig (Bourgaud et al., 2001), weshalb sich in der Forschung insbesondere die Wurzelkulturen durchgesetzt haben.

Die Produktion von Sekundärstoffen in Zellkulturen kann durch verschiedene Strategien gesteigert werden (Ramachandra Rao und Ravishankar, 2002). So sollte bereits zum Anlegen eines Kallus eine Elternpflanze ausgewählt werden, die das gewünschte Produkt in großen Mengen akkumuliert. Die hieraus resultierenden Kulturen sollten weiter auf Klone mit hoher Syntheserate selektiert werden. Beispiel ist die Shikonin-Produktion in Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon*, die durch gezielte Auswahl intensiv gefärbter Klone um das 13- bis 20-fache gesteigert werden konnte (Fujita et al., 1984). Auch Veränderungen der Zusammensetzung des Nährmediums können Einfluss auf die Biosynthese haben. So konnten Petersen und Mitarbeiter nicht nur zeigen, dass eine erhöhte Saccharose-Konzentration im Medium die Akkumulation der Rosmarinsäure fördert, sondern auch, dass die Biosynthese erst beginnt, wenn ein Nährstoff, beispielsweise Phosphat, dem Medium komplett entzogen wurde (Gertlowski und Petersen, 1993; Petersen et al., 1995). Andere einflussreiche Faktoren können Licht, Temperatur, pH-Wert des Mediums und die Zugabe eines Vorläufers oder Zwischenproduktes sein.



Abb. 1: Pflanzenkultur von *Melissa officinalis* in sterilen Wachstumsbedingungen



Abb. 2: Rosmarinsäure-produzierende Suspensionskulturen von *Melissa officinalis*

Viele Sekundärmetabolite, die aus Produkten des Phenylpropanstoffwechselwegs entstehen, werden von der Pflanze produziert, um diese gegenüber Umweltstress, z.B. Pathogenbefall oder UV-Bestrahlung, zu verteidigen (Dixon und Paiva, 1995). Ihre Biosynthese wird durch Signalmoleküle, sogenannte Elicitoren, induziert. Diese Moleküle können exogenen und endogenen Ursprungs sein. Endogene Elicitoren wie Jasmonsäure oder Salicylsäure sind hormonartige Substanzen, die der Signaltransduktion innerhalb einer Zelle, von Zelle zu Zelle oder sogar von einem Organ zu einem anderen dienen können. Exogene Elicitoren hingegen sind Substanzen, die von anderen Organismen abgesondert und von der Pflanze erkannt werden. An Rosmarinsäure-produzierenden

Zellkulturen (Abb. 1 und 2) konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von biotischen wie abiotischen Elicitoren eine vermehrte Sekundärstoff-Biosynthese angeregt werden kann (Szabo et al., 1999; Sumaryono et al., 1991; Ogata et al., 2004).

In vielen Fällen dienen Pflanzenzellkulturen nicht der Produktion der Sekundärstoffe, sondern werden zur Aufklärung des Biosynthesewegs und zur Isolierung und Klonierung beteiligter Enzyme genutzt (Alfermann und Petersen, 1995). Beispiele für Biosynthesewege, die mithilfe von Suspensionskulturen aufgeklärt werden konnten, sind die Flavonoid-Biosynthese in Petersilie, die Biosynthese der Anthocyane in *Haplopappus gracilis* und die Indolalkaloid-Synthese in Zellkulturen von *Catharanthus roseus* (Grisebach und Hahlbrock, 1977).

1.2 Rosmarinsäure

1.2.1 Entdeckung, Struktur und Verbreitung im Pflanzenreich

Die Rosmarinsäure (Abb. 3), der „Gerbstoff der Lamiaceen“ (Hermann, 1960), wurde erstmals 1958 von den italienischen Chemikerinnen Scarpati und Oriente aus Rosmarin (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae) isoliert und strukturell aufgeklärt. Es handelt sich um einen Ester aus Kaffeesäure und 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure.

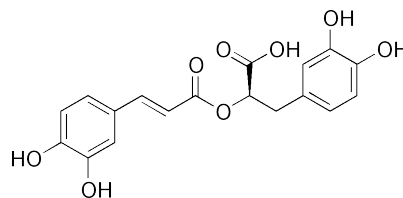


Abb. 3: Rosmarinsäure

Auch wenn neben der Rosmarinsäure noch eine Vielzahl weiterer Kaffeesäure-Ester und auch Derivate der Rosmarinsäure nachgewiesen werden konnten, gilt sie doch als der bedeutendste Labiatengerbstoff. Sie kann bis zu 6 % des Trockengewichts von Melissenblättern ausmachen (Parnham und Kesselring, 1985).

Ging man anfänglich davon aus, dass die Rosmarinsäure vorrangig von Vertretern der Lamiaceen und Boraginaceen synthetisiert wird, weiß man heute, dass ihr Erscheinen im Pflanzenreich sehr weit verbreitet ist. Nicht nur in Mono- und Dikotyledonen, sondern auch in einzelnen Vertretern der Hornmoose (Anthocerotaceae) (Takeda et al., 1990; Petersen, 2003; Vogelsang et al., 2005) und Farne (Blechnaceae) (Harborne, 1966; Bohm, 1968; Häusler et al., 1992) wurde Rosmarinsäure gefunden. Lediglich aus Gymnospermen konnte sie (noch) nicht isoliert werden (Tab. 1) (Petersen et al., 2009).

Unterklasse	Ordnung	Familie	Referenz
Anthocerophytina	Anthocerotales	Anthocerotaceae	Takeda et al., 1990; Petersen, 2003; Vogelsang et al., 2005
Filicophytina	Blechnales	Blechnaceae	Harborne, 1966; Bohm, 1968; Häusler et al., 1992
Spermatophytina aus der Klasse der Magnoliopsida			
Basale Ordnung der monokotyledonen Pflanzen			
	Chloranthales	Chloranthaceae	Zhu et al., 2008
	Alismatales	Araceae	Aquino et al., 2001
		Potamogetonaceae	Petersen, unveröffentlicht
		Zosteraceae	Ravn et al., 1994; Achamlale et al., 2009
		Cannaceae	Petersen und Simmonds, 2003; Yun et al., 2004
	Zingiberales	Marantaceae	Abdullah et al., 2008
		Melianthaceae	Lee et al., 2008
Eudikotyledone Pflanzen			
	Myrtales	Onagraceae	Huang et al., 2007
	Celastrales	Celastraceae	Ly et al., 2006
	Rosales	Rosaceae	Amzad Hossain et al., 2009
	Curcubitales	Curcubitaceae	De Tommasi et al., 1991
	Malvales	Malvaceae/Sterculiaceae	Satake et al., 1999
		Malvaceae/Tiliaceae	Lasure et al., 1994; Ho et al., 1995
	Gentianales	Rubiaceae	Aquino et al., 1990
	Lamiales	Lamiaceae	Scarpati und Oriente, 1958; Litvinenko et al., 1975; Janicsak et al., 1999; Pedersen, 2000
		Plantaginaceae	Kurkin et al., 1988 in Holzmannova, 1995; Velazquez Fiz et al., 2000
		Acanthaceae	Harborne, 1966
		Scrophulariaceae	Fernandez et al., 1995
	Apiales	Boraginaceae/	Kelley et al., 1975; Harborne, 1966, Petersen, unveröffentlicht
		Hydrophyllaceae	
		Apiaceae	Hiller, 1965; Hiller und Kothe, 1967; Parejo et al., 2004; Le Claire et al., 2005; Yoshida et al., 2005; Olivier et al., 2008
	Asterales	Araliaceae	Trute und Nahrstedt, 1996
		Asteraceae	Rubio et al., 1992
	Dipsacales	Dipsacaceae	Kowalczyk, 1996

Tab. 1: Publiziertes Vorkommen von Rosmarinsäure im Pflanzenreich. Systematik nach „Straßburger – Lehrbuch der Botanik“ (Bresinsky et al., 2008) (aus Petersen et al., 2009)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Rosmarinsäure im Pflanzenreich weit verbreitet auftritt, jedoch in vielen Familien auf wenige Arten beschränkt bleibt. Die Frage, ob sich die Biosynthese dieses Sekundärstoffes schon früh in der Evolution etabliert hat oder erst später unabhängig in verschiedenen Pflanzen entwickelt wurde, muss derzeit noch unbeantwortet bleiben.

1.2.2 Pharmakologische Wirkungen und Bedeutung als Sekundärstoff

Bereits bevor Scarpatti und Oriente (1958) die Rosmarinsäure isoliert hatten, waren die Labiatengerbstoffe als aktive Bestandteile vieler weltweit geschätzter Heilpflanzen bekannt. Zu diesen zählen vor allem solche Lippenblütler wie *Salvia officinalis*, *Melissa offi-*

cinalis, *Mentha x piperita*, *Thymus vulgaris* und die im ostasiastischen Raum verbreitete Schwarznessel, *Perilla frutescens*, aber auch Boraginaceen wie *Symphytum officinale*.

Aufgrund ihrer Struktur wurde schon früh die antioxidative Wirkung der Rosmarinsäure propagiert, die unter anderem von einem Forschungsteam um Andrade Furtado (2008) nachgewiesen werden konnte.

Andere Studien belegen eine Hemmung der Arachidonat 5-Lipoxygenase (5-LO), der Histamin-Freisetzung aus Mastzellen (Makino et al., 2000), der COX-2-Expression (Youn et al., 2003), des C3b-Faktors der Komplementkaskade (Sahu et al., 1999) und der Virus-Replikation (Swarup et al., 2007), auf denen entzündungshemmende, antikarzinogene und antivirale Wirkungen beruhen.

So ist es verwunderlich, dass die isolierte Rosmarinsäure bislang nicht als Arzneimittel eingesetzt wird, sondern nur als Konservierungsmittel Verwendung findet. Lediglich zwei Arzneimittel, deren Wirkungen auf den Rosmarinsäure-Gehalt zurück geführt werden, sind auf dem deutschen Markt erhältlich: Lomaherpan®, eine Creme mit Melisse-Extrakt zur Behandlung des Lippenherpes, und Traumaplast® mit Beinwell-Extrakt zur Linderung von Sportverletzungen.

Von den Pflanzen wird Rosmarinsäure vermutlich zur Abwehr von Fraßfeinden produziert (Petersen und Simmonds, 2003).

1.2.3 Biosynthese

Bereits 1970 begannen Ellis und Towers, den Biosyntheseweg der Rosmarinsäure an *Mentha*-Arten (*Mentha arvensis* und *Mentha piperita*, Lamiaceae) zu untersuchen. Dabei erkannten sie durch Fütterungsexperimente mit radioaktiv markierten Aminosäuren, dass der Kaffeesäure-Teil der Rosmarinsäure aus L-Phenylalanin entsteht und L-Tyrosin an der Biosynthese des 4-Hydroxyphenyllactats beteiligt ist.

Sieben Jahre später berichteten Razzaque und Ellis (1977) und Zenk et al. (1977) erstmals von Rosmarinsäure-Akkumulation in Zellkulturen von *Coleus blumei* (Lamiaceae).

Erst im Jahr 1993, zwei Jahrzehnte nach Beginn der Forschung, gelang es der Arbeitsgruppe um Petersen, den kompletten Biosyntheseweg der Rosmarinsäure in *Coleus blumei* aufzuklären (Abb. 4). Alle beteiligten Enzyme waren bis dahin identifiziert und teilweise isoliert worden. Als Forschungsobjekt dienten nach wie vor *Coleus*-Suspensionskulturen, da diese in weniger als zwei Wochen bis zu 21 % ihres Zelltrockengewichts an Rosmarinsäure akkumulieren können (Gertlowski und Petersen, 1993) und dementsprechend hohe Enzymaktivitäten aufweisen.

Die Biosynthese der Rosmarinsäure lässt sich in drei Prozesse gliedern: Umsetzung von L-Phenylalanin zu 4-Cumaroyl-CoA, Umwandlung von L-Tyrosin zu 4-Hydroxyphenyllactat sowie Veresterung der beiden Zwischenprodukte und abschließende Hydroxylierungen (Abb. 4).

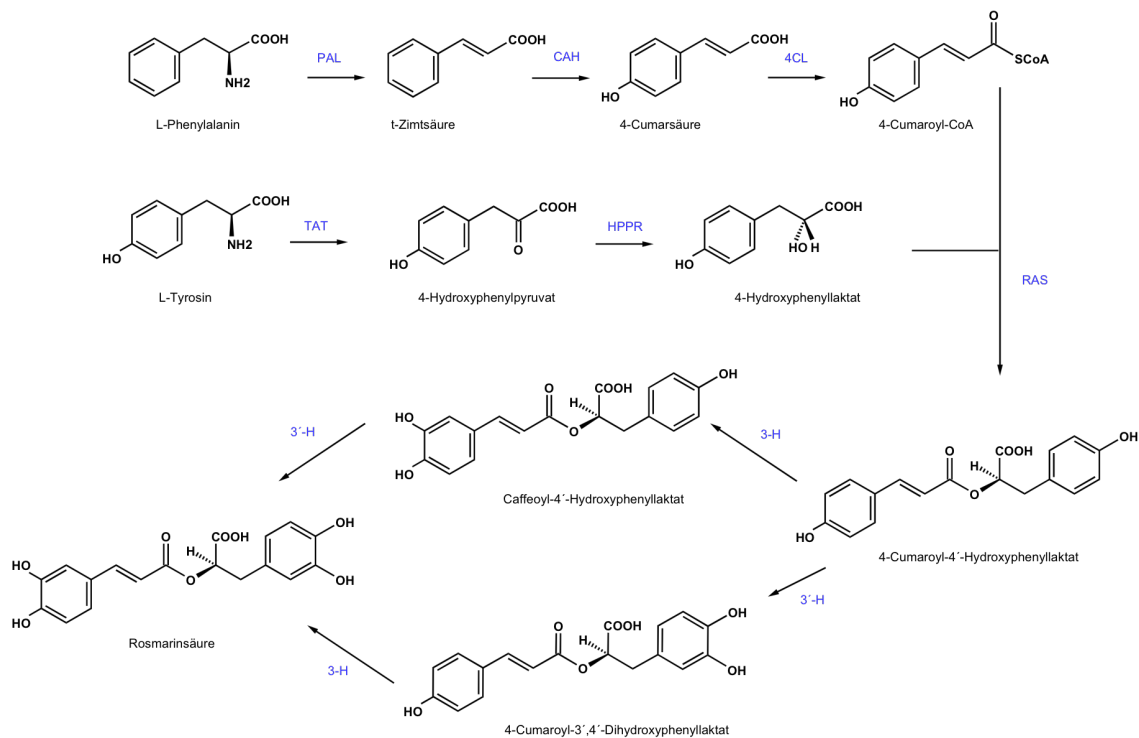


Abb. 4: Biosynthese der Rosmarinsäure

PAL: Phenylalanin Ammoniak-Lyase; CAH: Zimtsäure 4-Hydroxylase; 4CL: Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase; TAT: Tyrosin Aminotransferase; HPPR: Hydroxyphenylpyruvat Reduktase; RAS: Rosmarinsäure Synthase; 3-H: Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllactat 3-Hydroxylase; 3'-H: Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllactat 3'-Hydroxylase (aus Janiak, 2007)

Die Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels, Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) (Razzaque und Ellis, 1977), Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) (Vetter, 1988; Petersen, 1997) und Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL) (Karwatzki et al., 1990), setzen L-Phenylalanin in 4-Cumaroyl-CoA um. Parallel wird L-Tyrosin durch die Tyrosin Aminotransferase (TAT) in 4-Hydroxyphenylpyruvat umgewandelt (De-Eknamkul und Ellis, 1987), welches durch die Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR) zum entsprechenden Lactat reduziert wird (Petersen und Alfermann, 1988; Häusler et al., 1991). 4-Cumaroyl-CoA und 4-Hydroxyphenyllactat werden, katalysiert durch die Rosmarinsäure Synthase (RAS), verestert (Petersen und Alfermann, 1988). Membrangebundene Hydroxylasen führen den entstandenen Ester durch Hydroxylierungen in *meta*-Position in Rosmarinsäure über (Petersen, 1997).

Da viele Enzyme nicht spezifisch für die Rosmarinsäure-Biosynthese sind und sie auch an anderen Naturstoffbiosynthesen beteiligt sind, konnte ihre Beteiligung am Biosyntheseweg nur durch Korrelation ihrer Aktivität zur Rosmarinsäure-Akkumulation gezeigt werden (Petersen et al., 1993).

In den folgenden Kapiteln sollen die an der Biosynthese der Rosmarinsäure beteiligten Enzyme näher beschrieben werden.

1.2.4 Phenylalanin Ammoniak-Lyase

Die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5) ist eines der am besten, wenn nicht das am besten untersuchte Enzym des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Seit seiner Entdeckung durch Koukol und Conn (1961) konnte es in allen untersuchten höheren Pflanzen, aber auch in Bakterien- und Hefezellen nachgewiesen werden (Joos und Hahlbrock, 1992). Diese ubiquitäre Verbreitung in (Land-)Pflanzen kann sicherlich durch die Stellung als Schlüsselenzym zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel und ihre Beteiligung an der Bildung von Ligninmonomeren erklärt werden (Dixon und Paiva, 1995). PAL katalysiert die nichtoxidative Eliminierung von Ammoniak aus L-Phenylalanin, wobei *trans*-Zimtsäure entsteht (Abb. 5).

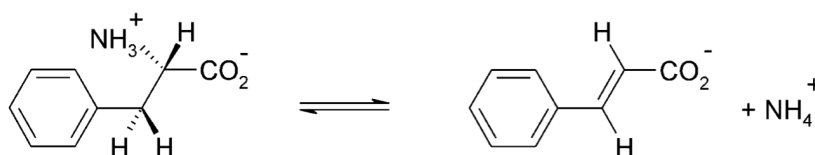


Abb. 5: Reaktion der PAL

Von Monokotylen weiß man, dass ihre PAL nicht nur L-Phenylalanin, sondern auch L-Tyrosin als Substrat akzeptiert, so dass durch die Desaminierung 4-Cumarsäure entsteht (Cochrane et al., 2004).

Unabhängig davon, welche dieser beiden Aminosäuren desaminiert wird, es handelt sich in jedem Fall um eine ungewöhnliche Reaktion, da augenscheinlich die notwendige elektrophile Gruppe im Enzym fehlt. Weil keine der bekannten Standardamino-säuren über eine elektrophile Funktion verfügt und die Anwesenheit eines Cofaktors ausgeschlossen werden konnte, muss die elektrophile Gruppe durch die posttranslationale Modifikation einer Aminosäure-Seitenkette gebildet werden. Durch Kristallisationsversuche konnten Ritter und Schulz (2004) beweisen, dass es sich bei dieser elektrophilen Gruppe um ein 4-Methyliden-imidazol-5-on (MIO) handelt. Dieses MIO entsteht aus einer autokatalytischen posttranslationalen Zyklisierung und Dehydratisierung eines Ala-Ser-Gly-Peptids (Abb. 6). Von Baedeker und Schulz konnte 2002 durch Untersuchungen an der Histidin Ammoniak-Lyase (HAL) gezeigt werden, dass dieser Prozess wahrscheinlich durch mechanischen Druck während der Faltung des Proteins ausgelöst wird.

Das Produkt der PAL, die *trans*-Zimtsäure, ist Ausgangsstoff des Phenylpropanoidstoffwechsels, der zu einer Vielzahl sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe führt. Sie alle verfügen über das gleiche Grundgerüst, einen Aromaten mit einer C3-Kette, der einfach, aber auch komplex verändert sein kann. Zu den Phenylpropanoiden zählen neben den Flavonoiden und Anthocyanen auch die Ligninmonomere sowie unzählige weitere Stoffe, die zum Teil wichtig für die Entwicklung der Pflanze sind oder eine wichtige Rolle bei der Verteidigung gegenüber Fraßfeinden und bei der Reaktion auf Umweltstress spielen.

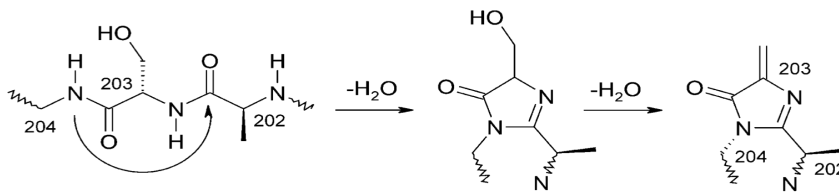


Abb. 6: Autokatalytische Bildung des MIO der PAL durch Zyklisierung und zweimalige Wasserabspaltung aus den Resten Ala²⁰²-Ser²⁰³-Gly²⁰⁴ (aus Ritter und Schulz, 2004)

Folglich übernimmt die PAL auch eine Schlüsselstellung in der Stressantwort, und das PAL-Gen kann bei Bedarf extrem schnell transkribiert werden (Dixon und Paiva, 1995). Wie andere Schlüsselenzyme des Phenylpropanoid-Biosynthesewegs wird auch die PAL häufig durch multiple Gene (Genfamilien) codiert. Ihre Zahl reicht von vier Kopien in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) bis über 40 im haploiden Chromosomensatz der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L., Solanaceae). Die Enzymaktivität in der Pflanze ist sehr unterschiedlich und abhängig von Entwicklungszustand, Zell- und Gewebedifferenzierung (Joos und Hahlbrock, 1992). Chang et al. (2008) gehen davon aus, dass die Expression alternativer Gene durch Umwelteinflüsse reguliert wird.

Die Beteiligung der PAL an der Rosmarinsäure-Biosynthese konnte bereits 1977 durch Razzaque und Ellis gezeigt werden. Beide hatten nachgewiesen, dass die PAL-Aktivität in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* mit der Rosmarinsäure-Akkumulation korreliert. Da die PAL ein Enzym des Phenylpropanoidstoffwechsels ist, lag die Vermutung nahe, dass eben dieser Stoffwechselweg die Umwandlung des L-Phenylalanins in den Kaffeesäureteil der Rosmarinsäure katalysiert.

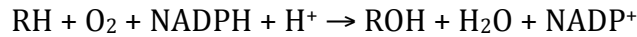
1.2.5 Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H)

Die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H, EC 1.14.13.11), das zweite Enzym des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels, katalysiert die Hydroxylierung der *t*-Zimtsäure an Position 4 des aromatischen Rings, wodurch 4-Cumarsäure entsteht.

Vetter konnte 1988 in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* die Beteiligung der C4H an der Rosmarinsäure-Biosynthese zeigen.

Als die C4H 1967 erstmals von Russell und Conn beschrieben wurde, war sie das erste Enzym der Cytochrom P450-Superfamilie, das in Pflanzen entdeckt wurde. Inzwischen ist bekannt, dass sich die Cytochrom P450-Enzyme (CYP450) schon früh in den Prokaryoten entwickelt haben und im Genom nahezu aller Organismen vorkommen. Auch wenn teilweise extrem große Unterschiede zwischen den Aminosäure-Sequenzen der bekannten CYP450 bestehen, gelegentlich beträgt die Identität gerade einmal 16 %, sind Struktur und Faltung dennoch beständig (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000). Bei den CYP450 handelt es sich um Häm-Proteine, die ein Eisen-Ion als Zentralatom und Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe enthalten. In allen finden sich weiterhin ein Cystein als 5. Ligand des Eisens sowie ein Glu-X-X-Arg-Motiv, das das aktive Zentrum

stabilisiert. Die katalysierten Reaktionen sind meist Hydroxylierungen, aber auch N-, O- und S-Dealkylierungen, Sulfoxidation, Epoxidierung, C-C- oder C-O-C-Kopplung, Desaminierung, Entschwefelung, Dehalogenierung, Peroxidierung und N-Oxid-Reduktion, von denen die Hydroxylierungen nach folgender allgemeiner Gleichung verlaufen:



Der Eisen-Cofaktor liegt im Häm zunächst oxidiert als Fe^{3+} vor. In diesem Oxidationszustand besteht nur eine geringe Tendenz, Sauerstoff (O_2) zu binden. Indem das Substrat an den Cofaktor bindet, geht das Eisen-Ion von einem low-spin Zustand in einen high-spin Zustand über. Dieser high-spin Zustand erleichtert die Reduktion des Eisen-Ions zu Fe^{2+} . Im nächsten Schritt wird ein Elektron, katalysiert durch die NADPH-abhängige CYP450-Reduktase, auf Fe^{3+} übertragen. Jetzt lagert sich O_2 an das CYP450 an. Durch Transfer eines zweiten Elektrons vom NADPH kommt es zur Umlagerung des Komplexes: Die O-O-Bindung wird gespalten, ein Sauerstoff-Molekül wird zu Wasser reduziert und das zweite in die C-H-Bindung des Substrates eingeschoben. Letztendlich diffundiert das Substrat als R-OH ab und das CYP450 liegt wieder in seinem Ausgangszustand vor (Abb. 7).

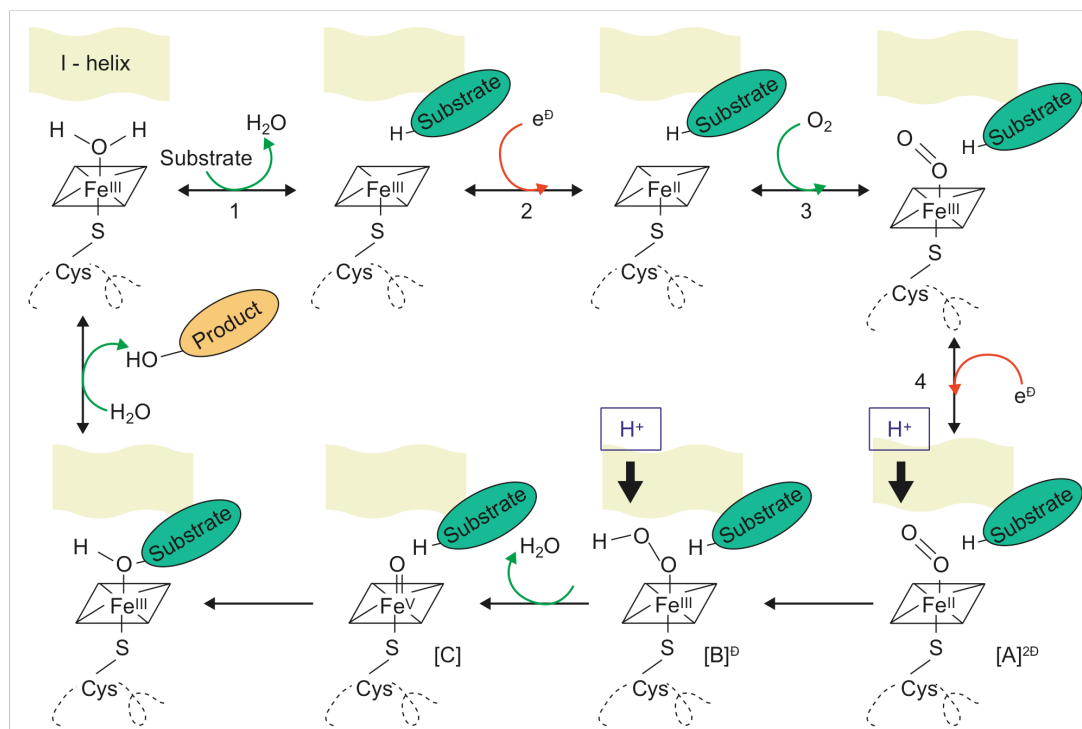


Abb. 7: Katalytischer Mechanismus der Cytochrom P450-Enzyme am Beispiel einer Hydroxylierungsreaktion. (aus Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000)

Abhängig davon, wie die Elektronen vom NADPH zum katalytischen Zentrum übertragen werden, unterscheidet man vier Klassen von CYP450 (Hornbrecher, 2005):

- I: Die Elektronenübertragung erfolgt über eine FAD-abhängige Reduktase auf ein Eisen-Schwefel-Redoxin und von dort weiter auf das Cytochrom. Zu dieser Klasse zählen Säugetiercytochrome der Mitochondrienmembran und Bakterien-cytochrome.
- II: Der Elektronentransport verläuft über ein FAD- und FMN-enthaltendes Flavoprotein, die NADPH:Cytochrom-P450-Reduktase, bei der die FAD-Untereinheit das Elektron von NADPH übernimmt und die FMN-Untereinheit das Elektron an das Cytochrom weitergibt. Quelle des zweiten Elektrons kann bei den Säugetiercytochromen, selten in Pflanzen-cytochromen, auch Cytochrom b_5 sein. Zu dieser Klasse zählen die meisten Pflanzen-CYP450. In der Zelle findet man sie an die Membran (Außenseite) des endoplasmatischen Retikulums gebunden.
- III: Zur Elektronenübertragung ist kein Elektronendonator erforderlich.
- IV: Die Elektronen werden direkt vom NAD(P)H auf das Cytochrom übertragen.

Bindet Kohlenmonoxid (CO) anstelle des molekularen Sauerstoffs im aktiven Zentrum, wird das Absorptionsmaximum des Häm zu 450 nm (Soret-Bande) verschoben. Dieses Charakteristikum gab der Enzymfamilie ihren Namen. Da CO mit hoher Affinität bindet und durch O_2 nicht verdrängt werden kann, hemmt es die Reaktion. Die CO-Bindung kann jedoch durch Bestrahlen mit Licht ($\lambda = 450 \text{ nm}$) gelöst werden.

1.2.6 Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL)

Das dritte und letzte Enzym des Phenylpropanoidstoffwechsels ist die Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL, EC 6.2.1.12). Zusammen mit den Luciferasen, Acetyl:CoA-Ligasen, Fettsäure-Synthasen und Peptidasen zählt sie zur Gruppe der Acyladenylat-bildenden Enzyme (Synonym: Acyl-aktivierende Enzyme), die die Aktivierung eines Substrates in einer charakteristischen Zweischnitt-Reaktion katalysieren (Schneider, 2005) (Abb. 8):

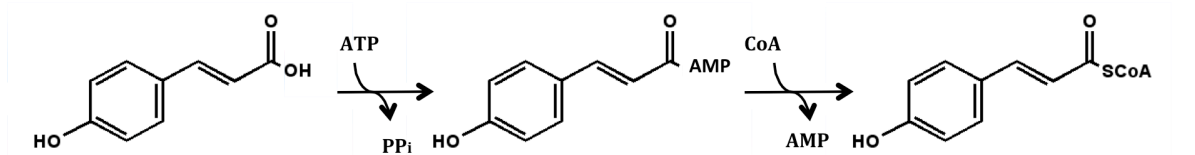


Abb. 8: Charakteristische Zweischnitt-Reaktion der 4CL

Nach Spaltung von ATP kommt es zur Aktivierung des Substrates. Dabei entsteht ein instabiles Adenylat-Zwischenprodukt, das an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden bleibt. Im nächsten Schritt erfolgt durch die freien Elektronen der Schwefelgruppe des Acylakzeptors ein nucleophiler Angriff auf das Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe. AMP wird freigesetzt und ein Thioester gebildet.

Schon 1993 erkannten Fulda et al., dass diese Superfamilie nicht nur über einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus verfügt, sondern auch eine gemeinsame konservierte Peptidsequenz aufweist: SSGTTGLPKGV. Diese als Box I bezeichnete Sequenz ist in 4CL hochkonserviert zu finden, in geringen Abwandlungen aber auch in den Aminosäuresequenzen aller übrigen Acyladenylat-bildenden Enzyme vorhanden.

Das sogenannte Box II-Motiv, GEICIRG, kann in allen 4CL nachgewiesen werden. Zunächst ging man davon aus, dass das zentrale Cystein an der Katalyse beteiligt ist. Diese These konnte jedoch im Jahr 2000 von Stuible et al. durch Mutationsversuche widerlegt werden. Weitere konservierte Regionen der 4CL sind das Heptapeptid RSKLPDI mit unbekannter Funktion am N-Terminus und ein mögliches AMP-Bindemotiv KGVMLT (Cukovic et al., 2001).

Die meisten 4CL akzeptieren als Substrat neben 4-Cumarsäure auch andere „Zimtsäuren“ (z.B. Kaffeesäure, Ferulasäure, *trans*-Zimtsäure und Sinapinsäure) (Abb. 9). Dabei können teilweise große Unterschiede in der Substratakzeptanz und -präferenz beobachtet werden (Lindermayr et al., 2002).

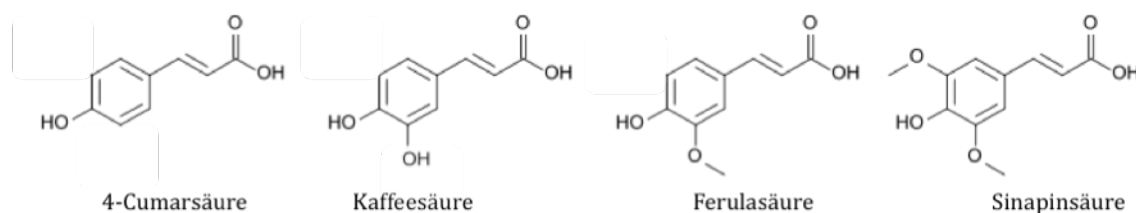


Abb. 9: Natürliche Substrate der 4CL

Bei genauer Untersuchung der 4CL von beispielsweise *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) (Ehlting et al., 1999; Cukovic et al., 2001), Petersilie (*Petroselinum hortense*, Apiaceae) (Knobloch und Hahlbrock, 1977), Pappel (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides* und *P. tremuloides*, Salicaceae) (Hu et al., 1998) und Tabak (*Nicotiana tabacum*, Solanaceae) (Lee und Douglas, 1996) war es möglich, in den einzelnen Pflanzen verschiedene Isoenzyme zu isolieren, die über unterschiedliche Expressionsprofile verfügen und demnach unterschiedliche Rollen im Phenylpropanoidstoffwechsel spielen müssen. Desweiteren konnten die bekannten 4CL in zwei wahrscheinlich phylogenetisch sehr alte Klassen unterteilt werden: Klasse II Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligasen sind an der Flavonoid-Biosynthese beteiligt, Klasse I-4CL an der Biosynthese der Ligninmonomere und anderer Phenylpropanoide (Cukovic et al., 2001).

1.2.7 Tyrosin Aminotransferase (TAT)

Durch Fütterungsversuche mit radioaktiv markierten Aminosäuren konnten Ellis und Towers 1970 zeigen, dass die Rosmarinsäure-Biosynthese alleine von den beiden Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin ausgeht.

Die Umwandlung des L-Tyrosins ist prinzipiell durch drei Enzyme möglich: Tyrosin 3-Hydroxylase, Tyrosin Oxidase und Tyrosin Aminotransferase. Bei genauerer Untersuchung der Enzymaktivitäten stellte sich heraus, dass keine Tyrosin 3-Hydroxylase-Aktivität in Rosmarinsäure-produzierenden Suspensionskulturen nachgewiesen konnten und dass die Aktivität der Tyrosin Oxidase nur sehr gering war und nicht mit der Rosmarinsäure-Akkumulation korrelierte. Allerdings gelang es De-Eknamul und Ellis (1987) zu zeigen, dass die Tyrosin Aminotransferase-Aktivität sowohl in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* als auch in solchen von *Anchusa officinalis* parallel mit der Rosmarinsäure-Akkumulation verläuft.

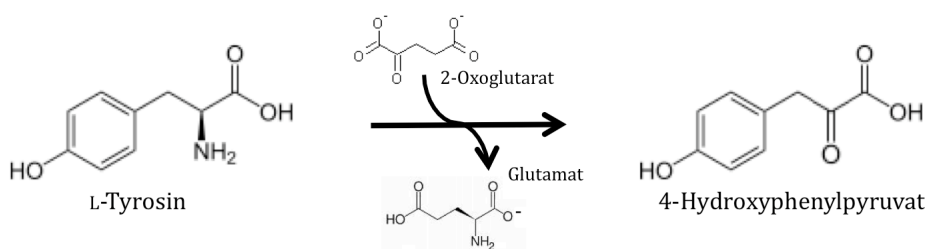


Abb. 10: Reaktion der Tyrosin Aminotransferase

Die Tyrosin Aminotransferase (TAT, EC 2.6.1.5) katalysiert die Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängige Transaminierung von L-Tyrosin mit 2-Oxoglutarat als Aminoakzeptor zu 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) und Glutamat (Abb. 10).

pHPP ist nicht nur ein Vorläufer für die Rosmarinsäure, sondern spielt, nach Umwandlung in Homogentisinsäure, auch eine Rolle bei der Biosynthese der Tocopherole und Plastochinone. Fiedler et al. (1982) konnten zeigen, dass pHPP in den Peroxisomen der Pflanzen, katalysiert durch eine Transaminase, aus L-Tyrosin gebildet wird.

Die Tyrosin-Aminotransferase zählt wie die Aspartat Aminotransferase zu einer großen Gruppe PLP-abhängiger Enzyme. Viele dieser Transaminasen spielen bei der Biosynthese von Aminosäuren eine Rolle und sind phylogenetisch miteinander verwandt. Konserviert sind zwei Aminosäuren: Lysin, im aktiven Zentrum, und Arginin. Durch den Argininrest, der mit der α -Carboxylgruppe der Ketosäure in Wechselwirkung tritt, wird die sterische Anordnung des Produktes, also die L-Konfiguration der Aminosäure, festgelegt (Berg et al., 2007).

Die TAT ist ein Dimer mit Lysin im aktiven Zentrum. Pyridoxalphosphat (PLP) ist in einer Schiff-Base-Verbindung an dieses Lysin gebunden. Im aktiven Zentrum liegt also zunächst ein internes Aldimin vor. Im ersten Schritt der Reaktion greift L-Tyrosin das α -Kohlenstoff-Atom am Lysin-Rest an, wodurch ein tetraedrischer Komplex entsteht, aus dem Lysin abgespalten wird. Zurück bleibt eine Schiff-Base, ein externes Aldimin, bestehend aus L-Tyrosin, das an PLP gebunden ist. Die α -Aminogruppe der Aminosäure hat die ϵ -Aminogruppe des Lysins aus dem aktiven Zentrum verdrängt. Durch zahlreiche, nichtkovalente Kräfte bleibt die Schiff-Base fest an das Enzym gebunden.

Im nächsten Schritt sorgt eine Base, vermutlich Lysin, dafür, dass ein Proton vom α -Kohlenstoff-Atom der Aminosäure abgegeben wird. Dies resultiert in einem chinoiden Zwischenprodukt, aus dem durch Reprotonierung am Aldehyd-C-Atom ein Ketimin gebildet wird. Im letzten Schritt wird das Ketimin zu 4-Hydroxyphenylpyruvat, einer 2-Oxosäure, und Pyridoxaminphosphat (PMP) hydrolysiert. Indem PMP seine Aminogruppe auf 2-Oxoglutarat überträgt, entstehen PLP und Glutamat. Das regenerierte PLP bindet erneut unter Freisetzung von Wasser an den Lysin-Rest des Enzyms, wodurch der Ausgangszustand wieder hergestellt wird (Berg et al., 2007) (Abb. 12).

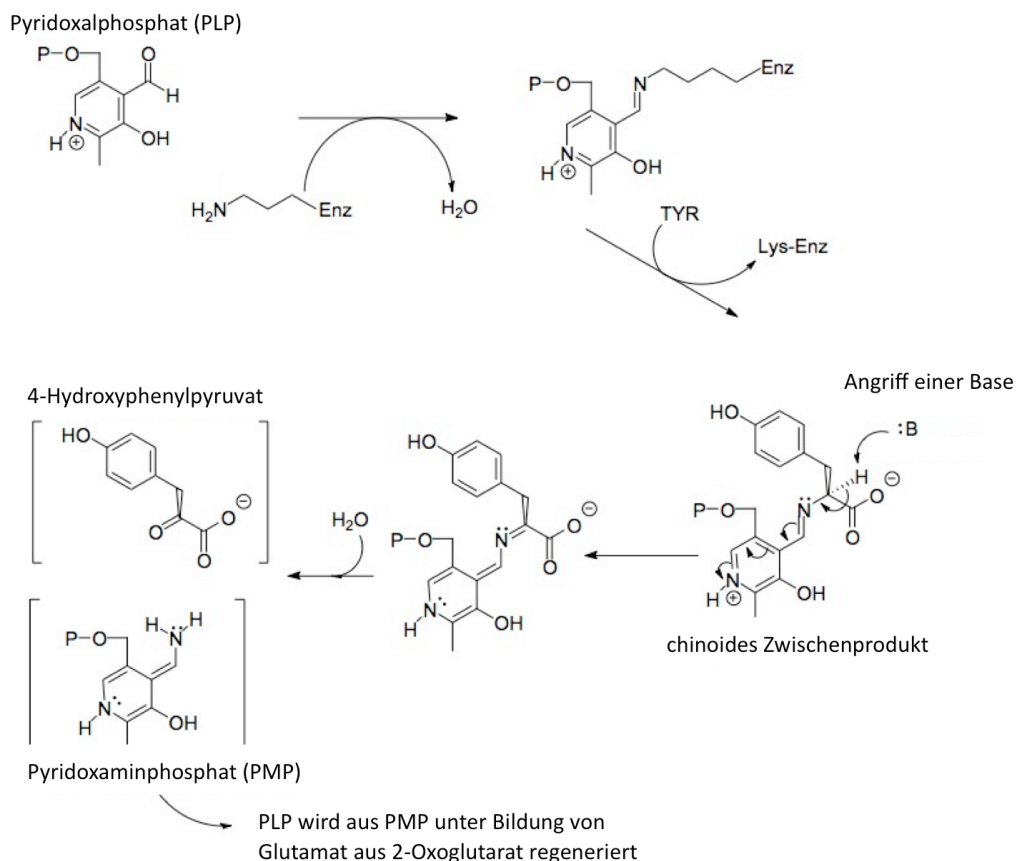


Abb. 12: Reaktionsmechanismus der TAT

In der Darstellung wurden folgende Abkürzungen verwendet: TYR = L-Tyrosin; Lys-Enz = an Enzym gebundenes Lysin; :B = angreifende Base

Die TAT kann nicht nur in Pflanzen, sondern vor allem in der Leber von Tieren und Menschen nachgewiesen werden. Hier ist sie für den Abbau des L-Tyrosins zuständig. Durch Vergleich 13 bekannter TAT-Peptidsequenzen konnte gezeigt werden, dass das TAT-Protein einerseits im Laufe der Evolution konserviert blieb und andererseits deutliche Ähnlichkeiten innerhalb taxonomischer Gruppen bestehen (Abb. 13) (Huang et al., 2007).

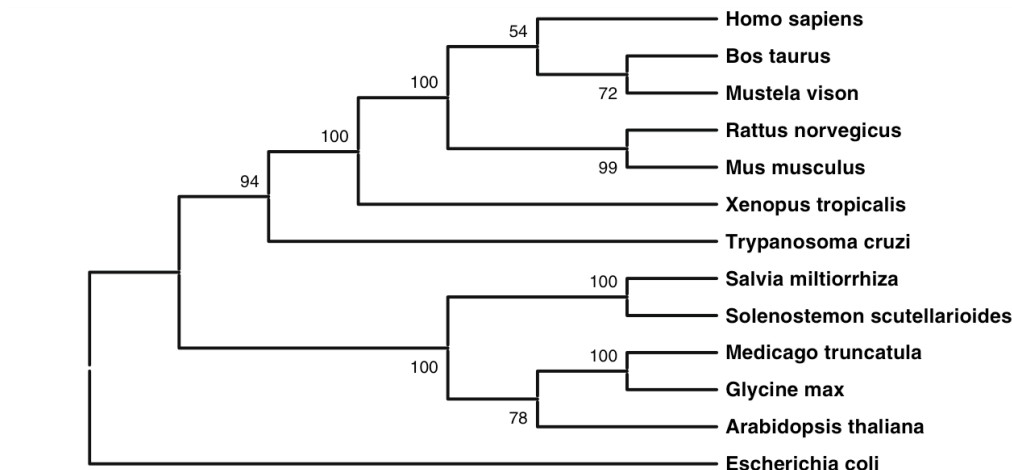


Abb. 13: Phylogenetischer Stammbaum 13 bekannter TAT-Sequenzen
(aus: Huang et al., 2008)

1.2.8 Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR)

De-Eknamkul und Ellis konnten nicht nur zeigen, dass die Tyrosin Aminotransferase das erste Enzym auf dem Weg von L-Tyrosin zur Rosmarinsäure ist, sondern auch, dass dieser Weg über 4-Hydroxyphenylmilchsäure (pHPL) verläuft (De-Eknamkul und Ellis, 1987).

pHPL entsteht durch Reduktion des 4-Hydroxyphenylpyruvats (pHPP), des Produktes der Tyrosin Aminotransferase (Abb. 14). Katalysiert wird diese Reaktion, die in Abhängigkeit von einem Reduktionsäquivalent verläuft, durch die Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR, EC 1.1.1.237).

Die HPPR wurde erstmals 1988 aus Suspensionskulturen von *Coleus blumei* von Petersen und Alfermann als Enzym der Rosmarinsäure-Biosynthese beschrieben und seitdem charakterisiert (Häusler et al., 1991), gereinigt und kloniert (Kim et al., 2004).

Da die Umwandlung von Phenylalanin zu 4-Cumaroyl-CoA durch Enzyme des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels katalysiert wird und das von der TAT gebildete 4-Hydroxyphenylpyruvat auch als Ausgangsstoff für die Tocopherol- und Plastochinon-Synthese dient, ist die HPPR möglicherweise das erste spezifische Enzym der Rosmarinsäure-Biosynthese (Kim et al., 2004).

Neben pHPP akzeptiert das Enzym auch 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat (DHPP) als Substrat. Die freie Hydroxygruppe an Position 4 des aromatischen Ringes scheint essentiell zu sein (Häusler et al., 1991). Als Cosubstrate werden sowohl NADH als auch NADPH akzeptiert.

HPPR zählt zur Gruppe der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen, die 1989 als neue Enzymfamilie definiert wurden (Grant, 1989). Mitglieder dieser Enzymfamilie akzeptieren als Substrate nur D-Isomere, die benachbart zu einer Säuregruppe

am C₂-Atom über eine Hydroxygruppe verfügen. Diese C₂-Hydroxygruppe wird zu einer Oxogruppe oxidiert, während NAD⁺ oder NADP⁺ reduziert werden (Abb. 16).

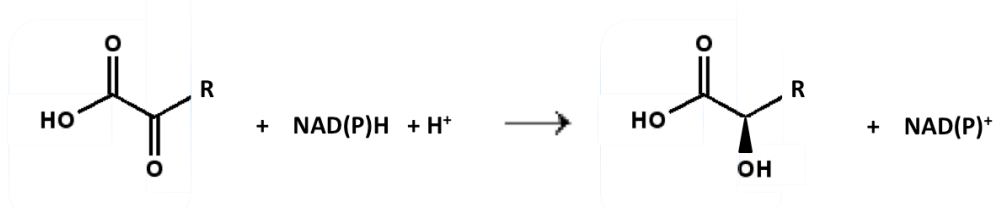


Abb. 14: Allgemeine Reaktion der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen

Die meisten bekannten Mitglieder der Familie der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen sind am Primärstoffwechsel beteiligt und stammen vorwiegend aus Prokaryoten. Beispiele sind D-Lactat Dehydrogenase (D-LDH), D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase und Hydroxypyruvat Reduktase (HPR). Letztere konnte 1991 von Schwarz et al. aus Gurke isoliert werden. Dort ist sie an der Photorespiration beteiligt. Eine Bestätigung der Beteiligung sowohl der peroxisomalen als auch der cytoplasmatischen HPR an der Photorespiration lieferten Timm et al., (2008) in *Arabidopsis*.

Die aus *Coleus blumei* klonierte HPPR reduzierte nicht nur pHPP und DHPP, sondern auch andere aromatische Substrate wie 4-Hydroxy-3-methoxyphenylpyruvat. Die höchste Substrataffinität konnte jedoch für Hydroxypyruvat, ein Zwischenprodukt der Photorespiration in Pflanzen, festgestellt werden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeiten zwischen den beiden Enzymen HPR und HPPR bleibt nun die Frage offen, ob es sich nicht gegebenenfalls um ein Enzym handelt, welches an zwei Stoffwechselwegen beteiligt ist: an der Photorespiration im Primärstoffwechsel und an der Rosmarinsäure-Biosynthese im Sekundärstoffwechsel (Petersen et al., 2009).

D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen liegen als Dimere, seltener als Tetramere vor (Kochhar et al., 1992). Die einzelnen Monomere bestehen aus zwei Domänen, Substrat-Bindedomäne (oder katalytische Domäne) und Cosubstrat-Bindedomäne (oder Nukleotid-Bindedomäne), zwischen denen sich das aktive Zentrum, die katalytische Spalte, befindet. Der genaue Ablauf der Reaktion ist nach wie vor unbekannt, es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass sich die beiden Domänen in vielen Fällen nach Bindung von Co-Substrat und Substrat aufeinander zubewegen und dadurch das aktive Zentrum zur Katalyse verengen (Lamzin et al., 1994; Booth et al., 2006). Janiak et al. (Publikation eingereicht) zeigte für die HPPR, dass es zu keiner Domänenbewegung kommt.

Aus pHPP entsteht durch die HPPR selektiv R(+)-4-Hydroxyphenyllactat. Dies konnte durch chirale HPLC gezeigt werden (Petersen, mündliche Mitteilung). R(+)-pHPL ist gleichzeitig das einzige Stereoisomer, das von der Rosmarinsäure-Synthase als Substrat akzeptiert wird (Petersen, 1991).

1.2.9 Rosmarinsäure Synthase (RAS)

Als Petersen und Alfermann 1988 die Rosmarinsäure Synthase im Enzymextrakt aus *Coleus blumei*-Suspensionskulturen entdeckten, nahmen sie zunächst an, dass durch die Veresterung von Kaffeesäure (aus Caffeoyl-CoA) mit 3,4-Dihydroxyphenyllactat direkt Rosmarinsäure gebildet wird. Später wurde klar, dass zwar ein Ester entsteht, dieser aber erst durch zwei weitere Hydroxylierungen in Rosmarinsäure umgewandelt wird. Da 4-Cumaroyl-CoA und 4-Hydroxyphenyllactat als natürliche Substrate des Enzyms postuliert werden konnten, müsste der systematische Name des Enzyms eigentlich Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase lauten. Der Name Rosmarinsäure Synthase wurde jedoch weiterhin beibehalten und soll auch im Folgenden verwendet werden.

Die Produkte der beiden Zweige der Rosmarinsäure-Biosynthese werden durch die Rosmarinsäure Synthase (RAS, EC 2.3.1.140) verknüpft. Es stellte sich heraus, dass das Enzym nur solche Hydroxyzimtsäure-Derivate akzeptiert, die durch Coenzym A aktiviert sind, wie 4-Cumaroyl-CoA, Caffeoyl-CoA oder Cinnamoyl-CoA. Der Hydroxyphenyllactat-Anteil muss über eine freie Hydroxylgruppe in Position 4 des aromatischen Rings verfügen und in R(+)-Konfiguration vorliegen. Die in *Coleus blumei* untersuchte RAS bevorzugt weiterhin monohydroxylierte Substrate, setzt aber auch 3,4-Dihydroxyphenyllactat (DHPL) und 3-Methoxy-4-hydroxyphenyllactat um (Petersen, 1991). Im Gegensatz zu anderen Hydroxycinnamoyltransferasen werden Shikimisäure und Chinasäure von der RAS nicht als Akzeptoren umgesetzt (Abb. 15) (Berger et al., 2006).

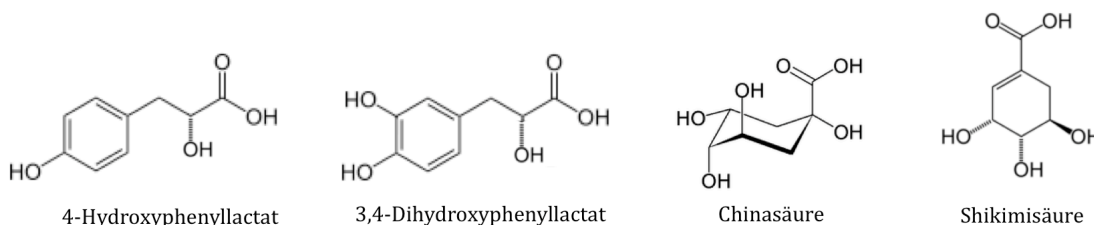


Abb. 15: Akzeptorsubstrate der Hydroxycinnamoyltransferasen.

Nach der Klonierung der RAS aus *Coleus blumei* konnte sie in die Gruppe der BAHD-Acyltransferasen eingeordnet werden (Berger et al., 2006). Die Charakteristika dieser Enzymfamilie fasste D'Auria 2006 in einem Übersichtsartikel zusammen:

Bei den BAHD-Acyltransferasen handelt es sich um eine große Gruppe von Enzymen, die Acyl-CoA-Ester in diverse sekundäre Pflanzenmetabolite umwandeln, aber auch im Primärstoffwechsel aktiv sein können. Der Name dieser Enzymfamilie leitet sich von den Anfangsbuchstaben der ersten vier Familienmitglieder ab: BEAT (Benzylalkohol *O*-Acetyltransferase aus *Clarkia breweri*, Onagraceae), AHCT (Anthocyanin *O*-Hydroxycinnamoyltransferase aus *Gentiana triflora*, Gentianaceae), HCBT (Anthranilat *N*-Hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase aus *Dianthus caryophyllus*, Caryophyllaceae)

und DAT (Deacetylvindolin 4-*O*-Acetyltransferase aus *Catharanthus roseus*, Apocynaceae). Alle bislang bekannten BAHD-Acyltransferasen sind Monomere mit einer molekularen Masse zwischen 48 und 55 kDa, die aus etwa 445 Aminosäuren bestehen. Gelegentlich kommt es vor, dass die Sequenzidentitäten gering sind und gerade einmal 25 – 34 % betragen. Von den beiden konservierten Motiven findet man eines, nämlich die HXXXD-Domäne in zentraler Position, auch in anderen Acyltransferasen. Dies lässt auf einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus schließen. Die DFGWG-Sequenz, welche sich kurz vor dem C-Terminus befindet, ist hingegen charakteristisch für BAHD-Acyltransferasen. Mutationsversuche, die zu Modifikation oder Verlust eines oder beider konservierter Motive führten, waren in der Lage, die Enzymaktivität drastisch zu verringern. Durch phylogenetische Studien gelang es, die Superfamilie der BAHD-Acyltransferasen in fünf Gruppen zu unterteilen. Der evolutionäre Ursprung aller Enzyme soll in den CAT (Chloramphenicol-Acyltransferasen) liegen.

Auch Ajmalin, ein Alkaloid mit antiarrhythmischer Wirkung, wird unter Beteiligung einer BAHD-Acyltransferase synthetisiert. Ma et al. gelang 2005 die Kristallisation der Vinorin Synthase als erstem Repräsentanten der Superfamilie. Aus den Ergebnissen der Kristallisation konnte unter anderem der Reaktionsmechanismus abgeleitet werden. Bei der Vinorin Synthase (VS, EC 2.3.1.160) handelt es sich um ein annähernd globuläres Protein, das aus zwei Hälften gleicher Größe zusammengesetzt ist, die durch eine Schleife miteinander verbunden sind. Das aktive Zentrum des Enzyms liegt in einem Kanal, der sich zwischen den beiden Domänen befindet. Der Histidin-Rest des HXXXD-Motivs liegt in diesem Kanal und kann von beiden Seiten erreicht werden. Überraschenderweise befindet sich das DFGWG-Motiv nicht im aktiven Zentrum, sondern auf der Außenseite des Proteins, und ist nicht an der Katalyse beteiligt.

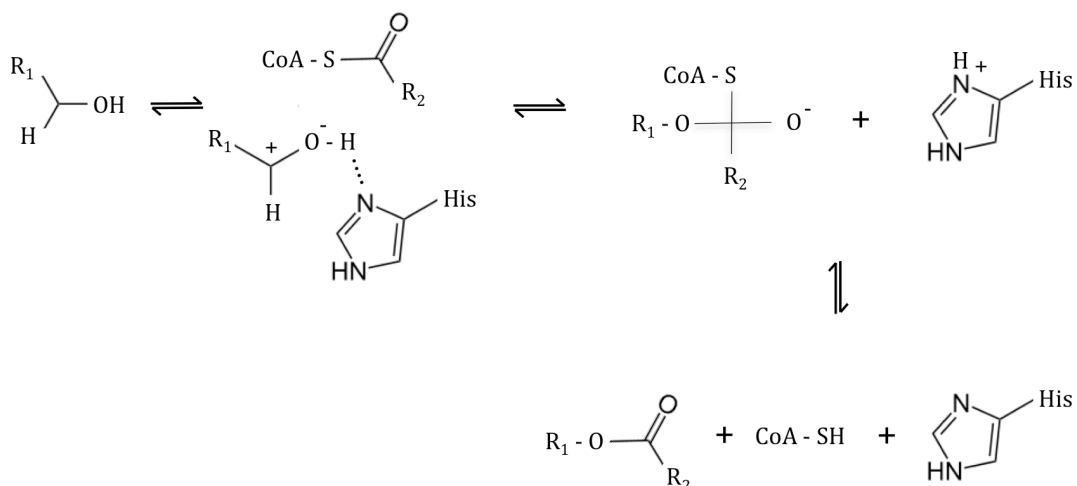


Abb. 16: Schematischer Reaktionsmechanismus der BAHD-Acyltransferasen

Im ersten Schritt der Reaktion deprotoniert der Histidin-Rest des HXXXD-Motivs das Sauerstoff- oder Stickstoff-Atom des Akzeptors. Im Falle der RAS wird das Proton der Hydroxylgruppe in Position 3 des entsprechenden Hydroxyphenyllactat-Derivates auf den Histidin-Rest übertragen. Nun kommt es zu einem nucleophilen Angriff des Akzeptor-Substrates auf das Carbonyl-C-Atom des CoA-Esters. Ein tetraedrisches Zwischenprodukt entsteht. Indem der Histidin-Rest das Proton an Coenzym A abgibt, entstehen freies CoA und ein Ester (Abb. 16).

Sequenzvergleich möglichst vieler RAS aus verschiedenen Spezies und Familien könnte Licht auf die Frage werfen, ob die Rosmarinsäure-Biosynthese schon früh in der Evolution aufgetreten ist oder sich unabhängig in verschiedenen Taxa entwickelt hat.

1.2.10 3- und 3'-Hydroxylasen

Von den vier Hydroxylgruppen der Rosmarinsäure stammt lediglich die OH-Gruppe an 4'-Position von einem der beiden Ausgangsstoffe des Biosynthesewegs, nämlich der Aminosäure L-Tyrosin, ab. Alle übrigen werden durch Enzyme eingeführt, die zur Superfamilie der Cytochrom P450-Enzyme (CYP450) zählen. Bei diesen drei Enzymen handelt es sich um die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H), einem Enzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels, und die 3- und 3'-Hydroxylase(n), welche 4-Cumaroyl-4'-hydroxyphenyllactat in zwei Schritten zur Rosmarinsäure umsetzen (Abb. 18) (Petersen, 1997).

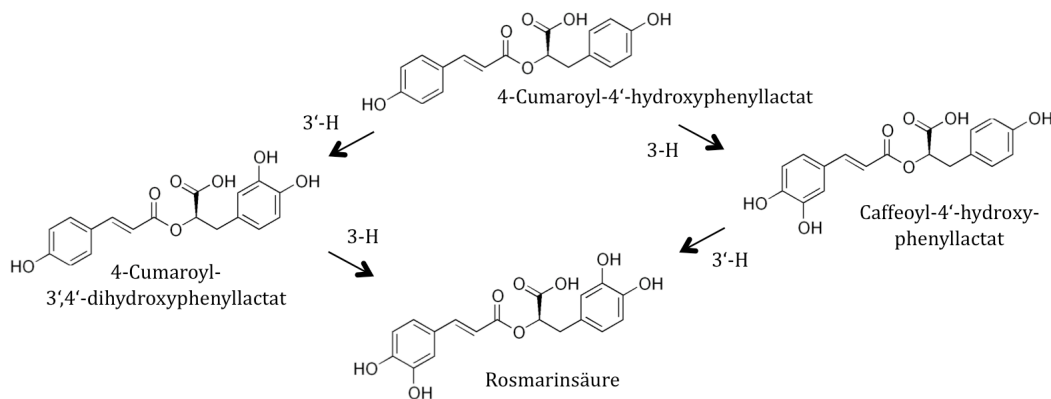


Abb. 18: Reaktionen der am Rosmarinsäure-Biosyntheseweg beteiligten 3- und 3'-Hydroxylasen (3-H und 3'-H).

In Mikrosomenpräparationen aus *Coleus blumei*-Suspensionskulturzellen konnte Petersen (1997) zeigen, dass die letzten beiden Hydroxylierungen von zwei Monooxygenaseaktivitäten katalysiert werden, die spezifisch für die Biosynthese der Rosmarinsäure sind. Diese Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllactat 3- und 3'-Hydroxylasen akzeptieren nur Rosmarinsäure-ähnliche Ester, sind aber nicht in der Lage, strukturell ähnliche

Substrate wie 4-Cumarsäure, 4-Cumaroyl-CoA, 4-Hydroxyphenylpyruvat und 4-Hydroxyphenyllactat umzusetzen.

2009 gelang Eberle et al. aus *Coleus blumei* die Klonierung und funktionelle Charakterisierung von CYP98A14 sowie die Isolierung der cDNA einer NADPH:Cytochrom P450-Reduktase (CPR). Beide konnten in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden. Interessanterweise katalysierte das Enzymsystem zwar vorwiegend die 3-Hydroxylierung von Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllactat, konnte aber auch die 3'-Hydroxylgruppe einführen.

CPR sind FAD- und FMN-enhaltende Flavoproteine, die als Elektronenüberträger für CYP450 fungieren. In CYP450 der Klasse II katalysieren sie die Elektronenübertragung vom NAD(P)H zum aktiven Zentrum (Hornbrecher, 2005).

Die Benennung der CYP450 erfolgt nach einem allgemein gültigen Schema: So steht hinter der Bezeichnung „CYP“, welche verdeutlichen soll, dass es sich hierbei um ein Cytochrom P450 handelt, eine Zahl, die das Enzym in eine der vielen Familien einordnet. Mitglieder jeder Familie teilen untereinander eine Sequenzidentität von mehr als 40 %. Als nächstes folgt ein Buchstabe, der die Subfamilie bezeichnet. Die Identität innerhalb der Subfamilie beträgt mindestens 55 %. Am Ende steht eine Nummer, die dem Gen selbst zugeordnet ist (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000).

Enzyme der CYP98-Familie führen Hydroxylgruppen in die *meta*-Position von Estern ein, die aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel stammen (Petersen et al., 2009). 4-Cumaroyl-Ester werden von allen bislang charakterisierten CYP98 bevorzugt umgesetzt. Unter Katalyse von CYP98A14 kommt es zur 3-Hydroxylierung von 4-Cumaroyl-3',4'-dihydroxyphenyllactat beziehungsweise zur 3'-Hydroxylierung von Caffeoyl-4'-hydroxyphenyllactat. Produkt der Hydroxylierung ist in beiden Fällen Rosmarinsäure.

Dass es sich bei CYP98A14, um ein spezifisches Enzym der Rosmarinsäure-Biosynthese handelt, konnte von Eberle et al. (2009) durch zwei Besonderheiten gezeigt werden: Zum einen werden sowohl 3- als auch 3'-Hydroxylierung katalysiert, sofern daraus Rosmarinsäure resultiert, zum anderen werden weder 4-Cumaroylshikimat noch 4-Cumaroylchinat umgesetzt, die von anderen CYP98 gleichfalls oder ausschließlich als Substrate akzeptiert werden.

1.3 Zitronenmelisse (*Melissa officinalis* L.)

Die Zitronenmelisse (*Melissa officinalis*) (Abb. 19) ist eine mehrjährige, krautige Pflanze, die zur Familie der Lamiaceen zählt. Wie alle anderen Mitglieder dieser Familie verfügt sie über einen deutlich vierkantigen Stengel und die charakteristischen Lippenblüten, die zu Beginn der Blütezeit blassgelb, später weiß bis blassrötlich gefärbt sind. Ihr angenehm zitroniger Geruch hat ihr ihren Namen verliehen.

Beheimatet war die Zitronenmelisse ursprünglich im östlichen Mittelmeerraum und im Nahen Osten, wo sie bereits in der Antike Verwendung fand. Virgil (70 – 19 v. Chr.) und Plinius (23 – 79) berichten von ihrer Verwendung in der Imkerei: Einerseits wurde sie als Bienenfutterpflanze angebaut, andererseits zum Ausreiben neuer Bienenstöcke verwendet, um Bienenvölker anzulocken. Zudem ist sie Teil von Dioscurides' (1. Jh. n. Chr.) „Materia medica“: Der griechische Arzt empfiehlt in seinem Werk wässrige oder alkoholische Auszüge der Melisse zur Behandlung von Insektenstichen, bei Menstruationsbeschwerden, gegen Bauchschmerzen und sogar zur Linderung rheumatischer Leiden (Babulka, 2005; Koch-Heitzmann und Schulze, 1988). Der berühmte arabische Arzt Avicenna (980 – 1037) beschreibt den Einsatz als Herztonikum.

Bis zum Mittelalter hatte sich die Melisse bereits nach Zentraleuropa verbreitet und als beliebte Heilpflanze etabliert. Auf Erlass Karls des Großen (747 – 814) wurde sie in allen Klostergärten angebaut. Sowohl Hildegard von Bingen (1098 – 1179) als auch Paracelsus (1493 – 1541) verwendeten die Melisse, die sie als „Bienenauge“ oder „Nervenkräutl“ bezeichneten, aufgrund ihrer sedativen und stimmungsaufhellenden Wirkung. Und im 15. Jahrhundert entwickelten Karmeliter ein Elixier (*Aqua carmelitanum*, *Spiritus aromaticus compositum*, *Spiritus melissae compositum*), welches innerlich als Stimulans und äußerlich als Desodorans verwendet wurde, und sich großer Beliebtheit erfreute (Babulka, 2005).

21

päische Pharmakopöe nennt in der Monographie „*Melissae folium*“ folgende Indikationen: Nervös bedingte Einschlafstörungen, funktionelle Magen-Darm-Beschwerden und Linderung der Beschwerden bei *Herpes simplex*-Infektionen. Volksmedizinisch schreibt man der Melisse auch eine beruhigende, krampflösende, verdauungsfördernde und entblähende Wirkung zu. Außerdem werden Melissenpräparate traditionell gegen Migräne, bei Hysterie und Melancholie eingesetzt (Wichtl, 2008)

Von der Zitronenmelisse sind mindestens drei Unterarten bekannt: *ssp. officinalis*, *ssp. inodora* und *ssp. altissima*, von denen lediglich *ssp. officinalis* offizinell verwendet wird (Carnat et al., 1998; Wolf et al., 1999). Verfälschungen und Verwechslungen kommen annähernd nicht vor, da die Droge gewöhnlich aus Kulturen stammt.

Als wirksame Bestandteile der Droge sind Hydroxyzimtsäure-Derivate (7–11 %, berechnet als Rosmarinsäure) und 0,05–0,3 % ätherisches Öl mit den Hauptkomponenten Citral (Gemisch aus Geranial und Neral), R-(+)-Citronellal und β -Caryophyllen zu nennen. Desweiteren wurden Monoterpenglykoside und andere Glykoside mit flüchtigen Aglyka in geringen Mengen gefunden. Gerade die Zusammensetzung des ätherischen Öls und der Ätherisch-Öl-Gehalt der Droge sind starken Schwankungen unterworfen, die von Anbaugebiet, Wetter, Erntezeitpunkt und Lagerbedingungen abhängen.

Aufgrund der dünnen Cuticula der Blätter ist das ätherische Öl sehr leicht flüchtig. Die jährlichen Verlustraten können bei Lagerung bis zur Hälfte des Gehaltes des Ausgangsmaterials betragen. Daher werden Melissenpräparate empfohlen, die Destillate der frischen Droge enthalten. Es sind allerdings auch Frischpflanzenextrakte auf dem Markt.

Wässrige Extrakte der Droge enthalten vorrangig Hydroxyzimtsäure-Derivate wie Rosmarinsäure und Kaffeesäure, die sogenannten „Labiatergerbstoffe“, aber auch Flavonoide und ein Sterol (Daucosterol) (Kurkin et al., 1995). Die Rosmarinsäure gilt als antioxidatives und antivirales Agens. Ihr Anteil am Trockengewicht der Melissenblätter kann bis zu 6 % betragen (Parnham und Kesselring, 1985). Die antibakteriellen und spasmolytischen Wirkungen werden hingegen dem ätherischen Öl zugeschrieben (Koch-Heitzmann und Schulze, 1984).

Das ätherische Melissenöl wird in der Aromatherapie eingesetzt. Allerdings ist es kaum im Handel zu finden. Üblicher ist das sogenannte „indische Melissenöl“, das aus *Cymbopogon*-Arten gewonnen wird (Wichtl, 2008).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Obwohl die Rosmarinsäure-Biosynthese und die an ihr beteiligten Enzyme bereits in Suspensionskulturen verschiedener Lamiaceen und Boraginaceen genauer untersucht wurden und werden, sind viele für die Biosynthese essentielle Regulationsmechanismen nach wie vor unklar.

Im Gegensatz zum amphitetraploiden *Coleus*, der sich hervorragend für die Aufklärung des Biosynthesewegs erwiesen hat, bietet die diploide Zitronenmelisse (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae) die Möglichkeit, eben jene Regulationsmechanismen auf genomischer

Ebene genauer zu studieren. Zuvor müssen die Kultur und die an der Biosynthese der Rosmarinsäure beteiligten Enzyme jedoch charakterisiert und eingehend untersucht werden. Diese Charakterisierung umfasst einerseits Enzymparameter wie K_m -Werte der wichtigsten Substrate, Temperatur- und pH-Optimum, andererseits die Aufklärung der cDNA-Sequenzen, die Expression einzelner Enzyme im Kulturverlauf und eine Untersuchung auf Isoformen.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten möglichst viele Daten über die Biosynthese der Rosmarinsäure in *Melissa officinalis* und die daran beteiligten Gene/cDNAs und Enzyme erarbeitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Suspensionskulturen von *Melissa officinalis*

Untersuchungsobjekt dieser Arbeit war eine Suspensionskultur von *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae), die seit mehreren Jahren in unserem Labor wöchentlich überimpft und im Dunkeln kultiviert wird und mir für meine Arbeit überlassen wurde.

2.1.2 Kulturmedien

Die Kultivierung der *Melissa officinalis*-Suspensionskulturen erfolgte in CB-Medium (Petersen und Alfermann, 1988).

Alle Komponenten des Mediums wurden in destilliertem Wasser gelöst (Tab. 2). Das fertige Medium wurde auf pH 5,5 eingestellt und zu 50 ml in 250 ml Erlenmeyerkolben portioniert. Anschließend mussten die mit Zellstoffstopfen verschlossenen Kolben für 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert werden.

Zur Erhaltung der Kultur wurden wöchentlich 5 g 7 Tage alte Zellen mit einem perforierten Metalllöffel in frisches Medium mit 2 % Saccharose überführt (CB2). Auch diejenigen Kulturen, welche der Enzymisolierung dienen sollten, wurden in CB2-Medium kultiviert. Die Kulturen wurden bei 25-26 °C im Dunklen auf einem Rundschüttler bei 110 UpM ständig geschüttelt.

Da jedoch bekannt ist, dass ein höherer Saccharose-Gehalt bei Rosmarinsäure-produzierenden Zellkulturen nicht nur zu höherem Zellwachstum, sondern auch zu verstärkter Produktion von Rosmarinsäure führt, wurde die Akkumulation der Rosmarinsäure sowie die Aktivität der verschiedenen Enzyme der Rosmarinsäure-Biosynthese über einen Zeitraum von 11 Tagen auch in solchen Kulturen untersucht, die in Medium mit 4 % Saccharose (CB4) kultiviert worden waren.

Makroelemente:	KNO ₃	2500	mg/l
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	250	mg/l
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	172	mg/l
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	150	mg/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	134	mg/l
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	25,6	mg/l
	Na ₂ -EDTA	34,3	mg/l
Mikroelemente:	H ₃ BO ₃	3	mg/l
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	3	mg/l
	MnSO ₄ · 5 H ₂ O	1	mg/l
	KI	0,75	mg/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25	mg/l
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,25	mg/l
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,25	mg/l
Hormone:	Kinetin	0,2	mg/l
	IES	0,5	mg/l
	2,4-D	2	mg/l
	NAA	0,5	mg/l
Vitamine:	Thiamindichlorid	10	mg/l
	Pyridoxin/HCl	1	mg/l
	Nicotinsäure	1	mg/l
weitere Zusätze:	NZ-Amine	2000	mg/l
	myo-Inosit	100	mg/l
	Saccharose	20/40	g/l

Tab. 2: Zusammensetzung des CB-Mediums

2.2 Charakterisierung einer Suspensionskultur von *Melissa officinalis*

2.2.1 Steriles Animpfen der Kulturen

Am Starttag der Charakterisierung (0. Tag) war es notwendig eine ausreichende Zahl von Kolben mit *Melissa officinalis*-Suspensionskulturen vorzubereiten. Hierzu wurden mit einem hitzesterilisierten perforierten Impflöffel in einer sterilen Werkbank möglichst genau 5 g Zellen einer 7 Tage alten Schüttelkultur in Kolben mit 50 ml Medium überführt. Die Kulturen inkubierten bei 26 °C im Dunklen auf einem Rundschüttler. Über bis zu 14 Tage mussten täglich zur gleichen Tageszeit 1 bis 2 Kolben als Probe genommen werden.

2.2.2 Bestimmung von Wachstumsparametern

Zellen und Medium konnten mit Hilfe eines Büchnertrichters mit Papierfilter und einer Wasserstrahlpumpe getrennt werden.

Zur Bestimmung des Frischgewichts wurden die trockengesaugten Zellen anschließend gewogen und auf diese Weise das Gewicht pro Kolben ermittelt.

Die Ermittlung des Trockengewichts erfolgte durch Einwiegen von 0,5 g dieser Zellen in Plastikreagenzgläser bekannten Gewichts. Nachdem diese bei -20 °C eingefroren und gesammelt gefriergetrocknet waren, wurden sie erneut gewogen. Aufgrund der bekannten Einwaage sowie des bekannten Tara-Gewichts der Reagenzgläser lässt sich durch Verrechnung mit dem Frischgewicht das Trockengewicht pro Kolben errechnen. Es wurden jeweils Doppelproben bestimmt.

2.2.3 Bestimmung von Mediumsparametern

Die Bestimmung der folgenden Parameter erfolgte aus dem zellfreien Medium:

pH-Wert der Lösung mit Hilfe einer geeichten pH-Elektrode.

Leitfähigkeit: Sie wird mithilfe einer Leitfähigkeitselektrode ermittelt und ist ein Maß für den Ionengehalt einer Lösung. Zur Bestimmung musste das Medium 1:5 mit bidestilliertem Wasser verdünnt werden.

Zuckergehalt: Die Messung erfolgte mit einem Refraktometer über den Brechungsindex.

2.2.4 Bestimmung des Rosmarinsäure-Gehalts

2.2.4.1 Extraktion

Zur Rosmarinsäureextraktion konnten die gefriergetrockneten Zellen der Trockengewichtsbestimmung verwendet werden. Dementsprechend wurde auch hier für jeden Kulturtag eine Doppelprobe bestimmt.

Die gefriergetrockneten Zellen wurden zunächst im Reagenzglas mit 2 ml 70 % Ethanol p.a. gründlich vermischt werden. Es folgte ein Aufschluss durch 10-minütiges Beschallen im Ultraschallbad bei 70 °C. Anschließend wurden die Proben erneut gründlich gemischt, ein zweites Mal für 10 Minuten bei 70 °C beschallt und wieder aufgewirbelt. Während des Aufschlusses waren die Reagenzgläser mit durchlöcherten Stopfen locker verschlossen. Zelltrümmer und Extrakt ließen sich durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 3.000 g trennen. Der Überstand, welcher die extrahierte Rosmarinsäure enthält, wurde in Eppendorf-Gefäße überführt.

2.2.4.2 HPLC-Analytik

Die Bestimmung der Rosmarinsäure-Gehalte der Extrakte erfolgte durch HPLC (analytische High Performance Liquid Chromatography). Hierzu war es nötig, die Extrakte mit Laufmittel zu verdünnen (1:10).

Vorsäule:	Equisil ODS, 5 µm, 20 x 4 mm
Trennsäule:	Equisil ODS, 5 µm, 250 x 4 mm
mobile Phase:	45% Methanol mit 0,01% o-Phosphorsäure isokratisch
Flussrate:	1 ml/min
Detektion:	333 nm
Probenschleife:	20 µl
Externer Standard:	25 µmol/l Rosmarinsäure

Das Säulenmaterial der stationären Phase besteht aus Kieselgel, welches mit einer definierten Anzahl C18-Ketten verestert ist. So erhält man eine „reversed phase“ Säule mit hydrophoben Eigenschaften. Hydrophile Substanzen eluieren schneller als hydrophobe, die stärker mit der Matrix wechselwirken.

Damit alle Substanzen in vollständig protonierter Form vorlagen und jeweils in einem Peak von der Säule eluierten, war es nötig, sowohl Laufmittel als auch die methanolische Lösung, die zum Verdünnen der Proben diente, anzusäuern.

2.2.5 Semiquantitative PCR

Die semiquantitative PCR sollte Aufschluss über die mRNA-Expressionslevel der Gene für PAL, 4CL und RAS im Kulturverlauf geben.

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, musste bei der Durchführung auf verschiedene Punkte geachtet werden: parallele Verarbeitung der zu vergleichenden Proben, exakt gleiche Zusammensetzung der PCR-Ansätze und optimale Zahl an PCR-Zyklen.

Während der Charakterisierung einer Zellkultur von *Melissa officinalis* wurden täglich wenige Gramm der in CB2-Medium kultivierten Suspensionskulturen in Aluminiumfolie verpackt und schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese schockgefrorenen Zellen wurden bis zur Isolierung der RNA (Kap. 2.4.1) bei -80 °C gelagert und später parallel weiterverarbeitet.

Um zu gewährleisten, dass jeder PCR-Ansatz exakt die gleiche Template-Menge enthält, wurde die RNA-Konzentration vor der Transkription bestimmt (Kap. 2.4.3). 2,7 µg jeder RNA wurden anschließend mit Hilfe des „Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.4.4).

Fehler, die beim Pipettieren der PCR-Ansätze geschehen können, sollten durch Mischen eines Mehrfach-Ansatzes, der später portioniert wurde, minimiert werden. Lediglich die cDNA wurde jedem Ansatz separat zugegeben (2 µl = 5,4 µg RNA).

Neben den Vollängenprimern für die einzelnen Gene enthielten die Ansätze zusätzlich Primer, die eine 315 Basen lange Sequenz der 18S-rRNA der kleinen Ribosomenuntereinheit flankieren. Diese dient als interner Standard. Kim et al. konnte 2003 zeigen, dass die 18S-rRNA, anders als die mRNA diverser Housekeeping-Gene (beispielsweise Aktin oder Tubulin) als äußerst verlässliche Referenz für die Gesamt-RNA-Menge angesehen werden kann.

18S:

18S for 5' – AGG AAT TGA CGG CCA AAC AC – 3'

18S rev 5' – GCA CAT CTA AGG GCA TCA CA – 3'

Zusammensetzung der Duplex-PCR-Ansätze:

	Einzelansatz	14x Ansatz
5x Puffer	5 µl	70 µl
25 mM MgCl ₂	2,5 µl	35 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl	14 µl
sense-Primer (10 mM)	1 µl	14 µl
antisense-Primer (10 mM)	1 µl	14 µl
18S-forward Primer (1 mM)	1 µl	14 µl
18S-reverse Primer (1 mM)	1 µl	14 µl
Aqua ster.	10,5 µl	147 µl
GoTaq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl	1,4 µl
Gesamtvolumen	23,1 µl	

Zur Quantifizierung der einzelnen Enzyme wurden folgende Primer herangezogen:

PAL:

Mo-PAL-VL5 5'- ATT AGA TAT GGA GAG CAT GAA CAA AGG AAC TGA -3'

Mo-PAL-VL3 5'- TAT ACA TAT GCT AGC AGA TAG GCA GAG GTG CAC -3'

T_{An} : 58 °C

t_{El} : 2,5 min

Sequenzlänge: 2130 bp

4CL:

4CLr-NdeI 5'- GCC CAT GGT TAG ACT GCA GCT GCT AAT CTT GAT -3'

4CLrcXhoI 5'- TAC TCG AGA TGG AGA ACC CGG CAG GC -3'

T_{An} : 52 °C

t_{El} : 2 min

Sequenzlänge: 1263 bp

RAS:

RAS VLn 5'- TTG GAT CCA TGA GGA TCG ATA TCA AGG ACT C -3'

RAS VL 3'rc 5'- TAG GAT CCT CAT CAA ATC TCA TAA AAC AAC TTC TC -3'

T_{An} : 54 °C

t_{El} : 2 min

Sequenzlänge: 1281 bp

Da die Zunahme der PCR-Produkte zunächst exponentiell erfolgt, später aber abnimmt, war es erforderlich, zuerst die optimale Zahl an Zyklen zu ermitteln. Dazu wurde eine PCR mit vier Parallel-Ansätzen vorbereitet.

Das PCR-Programm lautete wie folgt:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	2 min
x	94 °C	30 s
	T_{An}	1 min
	70 °C	t_{EL}
1	70 °C	10 min

Nach 20, 25, 30 und schlussendlich 35 Zyklen (x) wurde je eine Probe aus dem Cycler entnommen und bis zu Auswertung durch Gelelektrophorese bei 4 °C gelagert.

Bereits bei diesem Vorversuch zeichnete sich ab, dass eine Duplex-PCR mit Primern für 4CL und 18S keine guten Ergebnisse liefern würde. Da auch durch Versuche zur Optimierung der Annealing-Temperatur und durch Variation der eingesetzten Primer-Konzentration keine Verbesserung des Ergebnisses erzielt werden konnte, wurde für jedes Primerpaar ein eigener Ansatz pipettiert. Allerdings wurden alle Ansätze gemeinsam amplifiziert.

Im Unterschied zu obigem Duplex-Ansatz enthielt jeder dieser Ansatz anstelle des zweiten Primerpaares als Volumenausgleich zusätzlich 2 µl steriles, demineralisiertes Wasser.

Die Auswertung der semiquantitativen PCR erfolgte durch Gelelektrophorese (Kap. 2.4.2) in einem 2 %-igen Agarosegel, das klare, gut definierte Banden gewährleisten sollte. Dazu wurde der gesamte PCR-Ansatz mit 5 µl 6x Loading-Dye gemischt und in die Taschen des Gels geladen. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 110 V (6 V/cm) angelegt. Indem die Gele erst nach Abschluss der Elektrophorese durch 15-minütiges Schwenken in Ethidiumbromid-Lösung (20 µl 1 % Ethidiumbromid-Lösung/ 400 ml demineralisiertes Wasser) gefärbt wurden, konnte eine gleichmäßige Färbung erreicht werden. Ethidium-Ionen wandern während der Elektrophorese zur Kathode, weshalb Ethidiumbromid-haltige Gele gewöhnlich im Bereich der Taschen etwas stärker gefärbt sind als am unteren Rand. Abschließend wurde das Gel noch einmal 15 Minuten in reinem demineralisiertem Wasser geschwenkt, ehe die Dokumentation des Ergebnisses bei 312 nm erfolgte.

2.3 Allgemeine Methoden

2.3.1 Herstellen eines Proteinrohextraktes

Die Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten, mit Ausnahme der Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H)-Aktivität, erfolgte aus dem Proteinrohextrakt (RE).

Zu dessen Herstellung wurden 5 g der frischen, abgenutzten Zellen mit 1 g Polyclar 10® in einen Plastikzentrifugenbecher eingewogen. Hinzu wurden 5 ml 0,1 M K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer pH 7,0 mit 1 mM DTT pipettiert.

Die anschließende Enzymaufarbeitung erfolgte auf Eis, um proteolytischen Abbau so weit wie möglich zu vermeiden.

Für 3 mal 30 Sekunden wurden die Zellen mit einem Schlagmesserhomogenisator (Ultraturrax) aufgeschlossen, zwischendurch 30 Sekunden auf Eis gekühlt. Nach 20-minütigem Zentrifugieren bei 8.000 g und 4 °C konnte der Überstand vorsichtig als Proteinrohextrakt abgegossen und auf Eis aufbewahrt beziehungsweise bei -20 °C gelagert werden.

2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt wurde nach der 1976 von Bradford entwickelten Methode bestimmt. Das Prinzip dieser Methode ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G 250 durch Komplexbildung. Besonders Proteine mit kationischen oder nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten (vorrangig Arginin-, aber auch Tyrosin-, Tryptophan-, Histidin-, Phenylalanin-, Lysin- und Alanin-Resten) bilden durch Van der Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen stabile Farbstoff-

Proteinkomplexe. In sauren Lösungen liegt Coomassie Brilliant Blue G 250 in seiner ungebundenen (kationischen) Form vor (Absorptionsmaximum bei 470 nm). Durch Komplexbildung verschiebt sich das Gleichgewicht hin zur blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform, die bei 595 nm absorbiert (Compton und Jones, 1985).

Zur Herstellung der Bradford-Lösung wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 in 50 ml 96 % Ethanol p.a. und 100 ml 85 % *o*-Phosphorsäure gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und zweimal filtriert.

2 ml dieser Bradford-Lösung wurden mit 15 µl geeignet verdünnter Probelösung in Plastikküvetten gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Probe bei 595 nm photometrisch bestimmt. Als Referenz diente eine Leerprobe, welche 15 µl Puffer anstelle von Proteinlösung enthielt. Zur Quantifizierung diente eine BSA-Standard (1 mg/ml Rinderserumalbumin), welcher ebenso behandelt wurde. Üblicherweise wurden Doppelproben angesetzt.

2.3.3 Tests zur Bestimmung der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)-Aktivität

Zur Bestimmung der PAL-Aktivität stehen zwei Methoden zur Verfügung: photometrisch und via HPLC. Das Produkt *t*-Zimtsäure hat ein Absorptionsmaximum bei 290 nm. Bei hohen Enzymaktivitäten ist es möglich, aus der Extinktionszunahme bei dieser Wellenlänge auf die Aktivität des Enzyms rückzuschließen.

Bei geringen Enzymaktivitäten sowie zur Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums ist es jedoch sinnvoll, das entstandene Produkt mit Ethylacetat auszuschütteln und anschließend durch HPLC zu quantifizieren.

2.3.3.1 Bestimmung der Enzymaktivität mithilfe eines Photometers

Der Test erfolgte in einem auf 36 °C vorgewärmten Photometer.

In einem Testvolumen von 500 µl waren enthalten:

	Probe	Referenz
Borsäure/Borax-Puffer pH 8,8	400/430 µl	450/480 µl
bestehend aus		
0,078 mol/l H ₃ BO ₃ , 0,03 mol/l Na ₂ B ₄ O ₇		
und 0,02 mol/l NaCl		
0,1 M L-Phenylalanin	50 µl	-

Nach 2-minütiger Vorinkubation im Photometer wurden 50 µl Proteinrohextrakt bzw. 20 µl Lösung mit rekombinantem Protein zu Probe und Referenz pipettiert. Unmittelbar nach Mischen des Testansatzes wurde mit der Messung begonnen. Die Messung erfolgte bei 290 nm über einen Zeitraum von 5 Minuten.

Mit Hilfe der Extinktionszunahme ΔE ist es möglich, die (spezifische) Aktivität des Enzyms zu berechnen. Die Berechnungsformel entspricht der in Abschnitt 2.3.5 genannten. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt 10 cm²/µmol.

2.3.3.2 Bestimmung der Enzymaktivität durch HPLC

In 1,5 ml-Eppendorfgläser wurden pipettiert:

180 µl	Borsäure/Borax-Puffer pH 8,8
50 µl	0,1 M L-Phenylalanin

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl Enzym-Lösung und unmittelbares Mischen des Ansatzes gestartet.

Nach einer Inkubationszeit von 10 min (Proteinrohextrakt) bzw. 5 min (rekombinantes Protein) bei 36 °C konnte der Test durch Zugabe von 20 µl 6 N HCl gestoppt werden. Das entstandene Produkt *t*-Zimtsäure wurde quantitativ mit Ethylacetat (zweimal 500 µl) ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden zur Trockene eingedampft, der Rückstand schließlich in 50 – 100 µl 50 % MeOH/0,01 % H₃PO₄ aufgenommen.

Die HPLC-Analyse erfolgte in dem unter 2.2.4.2 beschriebenen System.

Fließmittel: 60 % MeOH mit 0,01 % *o*-Phosphorsäure

λ = 290 nm

Fluss: 1 ml/min

externer Standard: 25 µmol *t*-Zimtsäure/l

2.3.4 Bestimmung der Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H)-Aktivität

Die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) zählt zu den Cytochrom P450-Enzymen, die in den Mikrosomen, d.h. Fragmenten vorwiegend des Endoplasmatischen Retikulums, zu finden sind. Zur Bestimmung der C4H-Aktivität müssen diese Mikrosomen daher zunächst isoliert werden.

2.3.4.1 Isolierung der Mikrosomen

Zuerst wurde das Zellmaterial (*Melissa officinalis*-Suspensionszellen) mit Polyclar 10[®] eingewogen (1 g/5 g Zellmaterial). Bei Polyclar 10[®] handelt es sich um ein Poly(vinylpolypyrrolidon), welches unlösliche Komplexe mit phenolischen Substanzen und deren Oxidationsprodukten bildet. Auf diese Weise können jene abtrennt und die Bildung proteininaktivierender Phenole unterbunden werden.

Der Aufschluss erfolgte in einem auf Eis gekühlten Mörser. Hier wurden die Zellen mit einer äquivalenten Menge 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5 (mit 1 mM DTT und 1 mM DCEA) und dem Polyclar 10[®] zu einem homogenen Brei verrieben. Als Reduktionsmittel verhindert DTT (Dithiothreitol) die Bildung von Disulfidbrücken und schützt auf diese Weise die SH-Gruppen von Enzymen. Wurde zusätzlich etwas Seesand in den Mörser gegeben, konnte die Effektivität des Aufschlusses gesteigert werden.

Durch Zentrifugieren (8.000 g, 20 min, 4 °C) wurde ein Überstand erhalten, welcher auf Eis unter ständigem Rühren mit einer 1 M MgCl₂-Lösung versetzt wurde, bis eine Endkonzentration von 50 mM erreicht war. Die präzipitierten Membranen ließen sich schließlich durch 20-minütige Zentrifugation (20.000 g, 4° C) gewinnen.

Das auf diesem Weg erhaltene Pellet wurde vom Überstand befreit, zweimal mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5 (mit 1 mM DTT und 1 mM DIECA) abgespült und schließlich in 3 ml desselben Puffers aufgenommen. Nachdem das Pellet mit einem Glashomogenisator nach Potter-Elvehjem vollständig suspendiert worden war, konnte die Suspension über ein PD 10-Säulchen (GE Healthcare) entsalzt oder umgepuffert werden.

2.3.4.2 Bestimmung der Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H)-Enzymaktivität

Für jede Probe wurden folgende Lösungen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert:

40 µl	0,1 M	Tris/HCl-Puffer pH 7,5	
25 µl	0,1 M	DTT	entsprechend 10 mM
10 µl	5 mM	<i>t</i> -Zimtsäure (in 50% MeOH)	0,2 mM
25 µl	5 mM	NADPH	0,5 mM

Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl Mikrosomensuspension (MS, eingestellter Proteingehalt 0,83 mg/ml entsprechend 0,5 mg Protein/Ansatz) zu den vorgewärmten Proben. Nach sofortigem Schütteln erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 25 °C. Die Reaktion wurde nach zehn Minuten durch Zugabe von 25 µl 6 N HCl, erneutes Schütteln und sofortiges Abkühlen auf Eis beendet. Um das Reaktionsprodukt 4-Cumarsäure zu extrahieren, wurden die Ansätze zweimal mit je 500 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Die gesammelten Überstände wurden über Nacht im Exsikkator getrocknet. Die Bestimmung der C4H-Aktivität erfolgte per HPLC. Hierzu wurde der Rückstand in 50 µl Methanol p.a. mit 0,02 % *o*-Phosphorsäure (85 %) rückgelöst und mit einem äquivalenten Volumen Aqua bidest. verdünnt.

Das HPLC-System ist unter 2.2.4.2 näher beschrieben.

4-Cumarsäure konnte bei einer Wellenlänge von 311 nm detektiert werden. Der externe Standard hatte eine Konzentration von 25 µmol/l.

2.3.5 Standardtest zur Bestimmung der Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL)-Aktivität

Die Aktivität der Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL) kann photometrisch ermittelt werden. Im optischen Test wird die Zunahme an Hydroxyzimtsäure-CoA-Estern in dem für den jeweiligen Ester charakteristischen zweiten Absorptionsmaximum gemessen. So kann der Ester der Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) bei 346 nm registriert werden. 4-Cumaroyl-CoA, welches aus 4-Cumarsäure entsteht, wird bei 333 nm gemessen. Weitere mögliche Substrate der 4CL sind beispielsweise Zimtsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure.

In Quarzküvetten von 1 ml-Volumen wurden pipettiert:

860 µl	0,1 M	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ -Puffer pH 7,5	entsprechend
50 µl	10 mM	Hydroxyzimtsäure-Derivat (gelöst in 50 % MeOH p.a.)	0,5 mM
20 µl	125 mM	ATP	2,5 mM

20 µl	125 mM	MgCl ₂	2,5 mM
10 µl	0,1 M	DTT (Substrat 4-Cumarsäure)	1,0 mM
		oder Aqua dest. (Substrat Kaffeesäure)	

Die Referenz enthielt zusätzlich 10 µl Aqua dest..

Die vorbereiteten Küvetten wurden in den Küvettenhaltern des Photometers auf 40 °C vorgewärmt, ehe zu Probe wie Referenz 20 µl des entsprechend verdünnten Proteinrohextraktes pipettiert wurden. Durch die Zugabe von 10 µl 10 mM CoA-Lösung zur Probe wurde die Reaktion gestartet.

Die spezifische Aktivität konnte mit Hilfe der Steigung im linearen Teil der Extinktionskurve berechnet werden:

$$\text{Spezifische Aktivität } [\mu\text{kat/kg}] = \frac{\Delta E * V_{\text{Ansatz}} * 10^6}{C_{\text{Protein}} * V_{\text{Protein}} * d * t * \epsilon}$$

ΔE	Steigung im linearen Teil der Extinktionskurve [1/min]		
V_{Ansatz}	Volumen des Testansatzes [ml]		
C_{Protein}	Proteinkonzentration [mg/ml]		
V_{Protein}	Volumen Proteinrohextrakt [µl]		
d	Schichtdicke der Küvette [1 cm]		
t	Messzeit = 60 s, da ΔE pro min angegeben wird		
ϵ	Extinktionskoeffizient [cm ² /µmol]:		
	Caffeoyl-CoA	18 cm ² /µmol	$\lambda = 346 \text{ nm}$
	4-Cumaroyl-CoA	21 cm ² /µmol	333 nm
	Cinnamoyl-CoA	22 cm ² /µmol	311 nm
	Feruloyl-CoA	19 cm ² /µmol	345 nm
	Sinapoyl-CoA	20 cm ² /µmol	352 nm

2.3.6 Bestimmung der Tyrosin Aminotransferase (TAT)-Aktivität

Bei der TAT handelt es sich um ein lösliches Enzym, dessen Aktivität im Proteinrohextrakt nachgewiesen werden kann.

In einem Gesamtvolumen von 250 µl enthielt der Testansatz

163 µl	1 M	Tris/HCl-Puffer pH 9,0	
10 µl	2 mM	Pyridoxalphosphat (PLP)	entsprechend 0,08 mM
20 µl	400 mM	2-Oxoglutarat	32 mM
50 µl		Proteinrohextrakt	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 µl 150 mM L-Tyrosin (gelöst in 0,5 M HCl) und unmittelbares Mischen gestartet. Der Testansatz inkubierte 10 Minuten bei 40 °C im Wasserbad, ehe die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 6 N HCl abgestoppt wurde. Auch bei diesem Enzymtest konnte das entstandene Produkt 4-Hydroxyphenylpyruvat

(pHPP) durch zweimaliges Ausschütteln mit je 500 µl Ethylacetat p.a. quantitativ extrahiert werden. Nachdem die vereinigten Ethylacetat-Phasen eingedampft waren, wurden die Rückstände zunächst in 30 µl MeOH p.a. mit 0,02 % *o*-Phosphorsäure gelöst und schließlich mit einem äquivalenten Volumen Aqua dest. verdünnt.

Die HPLC-Analyse erfolgte mit dem Fließmittel 35 % MeOH/0,01 % H₃PO₄. Detektiert wurde bei 283 nm. Als externer Standard wurde eine 100 µM pHPP-Lösung eingesetzt.

2.3.7 Standardtest zur Bestimmung der Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR)-Aktivität

Die Aktivität der Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR) wird über HPLC bestimmt, da das entstandene Produkt 4-Hydroxyphenyllactat (pHPL) quantitativ mit Ethylacetat ausgeschüttelt und schließlich bei 280 bzw. 220 nm quantifiziert werden kann.

In 1,5 ml-Eppendorfgefäße wurde folgender Ansatz pipettiert:

150 µl	0,1 M	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ -Puffer pH 7,0	
10 µl	1 mM	Ascorbat	entsprechend 10 nmol
10 µl	100 mM	DTT	1 mmol
20 µl	25 mM	pHPP (gelöst in 20 % Ethanol p.a.)	0,5 mmol
10 µl	50 mM	NAD(P)H	0,5 mmol

Der Test konnte mit NADH oder NADPH als Reduktionsäquivalent durchgeführt werden. Enzymtests zur Bestimmung der Aktivität im Kulturverlauf sowie zur Ermittlung des Temperatur- und pH-Optimums enthielten das Substrat pHPP mit dem Cosubstrat NADH. K_m-Werte wurden mit beiden Substraten ermittelt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Proteinrohextrakt und sofortigem Schütteln des Ansatzes gestartet. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zupipettieren von 25 µl 6 N HCl und Schütteln abgestoppt. Anschließend wurde zweimal mit je 500 µl Ethylacetat ausgeschüttelt, die gesammelten Ethylacetat-Phasen eingedampft und die trockenen Rückstände in 100 µl Methanol p.a. mit 0,01 % *o*-Phosphorsäure rückgelöst.

Die HPLC-Analyse erfolgte mit dem Laufmittel 10 % MeOH/0,01 % H₃PO₄. Detektiert wurde das entstandene Reaktionsprodukt photometrisch bei 280 bzw. 220 nm. Der externe pHPL-Standard hatte eine Konzentration von 25 µmol/l.

2.3.8 Standardtest zur Bestimmung der Rosmarinsäure Synthase (RAS)-Aktivität

Der Standardenzymtest zur Bestimmung der RAS-Aktivität hatte ein Endvolumen von 125 µl und enthielt

12,5 µl	0,1 M	DTT	entsprechend	1,0 mM
10 µl	12,5 mM	Ascorbat		1,0 mM
10 µl	2,5 mM	Caffeoyl-CoA		0,2 mM

5 µl	20 mM	pHPL	0,8 mM
67,5 µl	0,1 M	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 7,0	

Durch Zugabe von 20 µl Proteinrohextrakt und sofortiges Umschütteln wurde die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 30 °C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 6 N HCl gestoppt.

Zur Analyse wurden die Reaktionsprodukte zweimal mit je 500 µl Ethylacetat p.a. ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden bis zur Trockene eingedampft, ihre Rückstände schließlich in 100 µl 50 % Methanol p.a. mit 0,01 % *o*-Phosphorsäure gelöst und über HPLC analysiert.

Das Reaktionsprodukt Caffeoyl-pHPL konnte bei einer Wellenlänge von 333 nm detektiert werden. Ein entsprechender Standard war von D. Eberle hergestellt und auf eine Konzentration von 25 µmol/l eingestellt worden.

2.3.9 Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Bei der Ammoniumsulfat-Fällung handelt es sich um eine einfache und wirkungsvolle Methode zur groben Reinigung und Aufkonzentrierung von Proteinen (Cooper, 1981).

In Lösung sind Proteine von Hydrathüllen umgeben. Salz-Ionen konkurrieren um diese Hydrathülle. Die Oberflächenladung der Proteine bestimmt, bei welcher Ammoniumsulfat-Konzentration ein Protein so weit dehydratisiert ist, dass es ausfällt. Demzufolge fallen hydrophobe Proteine schneller aus als hydrophile.

Die Ammoniumsulfat-Fällung wurde insbesondere zur Anreicherung der Hydroxyphenylphenylpyruvat Reduktase (HPPR) genutzt, da deren Enzymaktivität im Rohextrakt oftmals zu gering war, um K_m-Werte genau genug zu ermitteln.

Um den Fällungsbereich des gewünschten Proteins zu ermitteln, ist es nötig, eine fraktionierte Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄)-Fällung durchzuführen.

Die hierzu verwendete (NH₄)₂SO₄-Lösung muss gesättigt sein. Ihr pH-Wert wird so eingestellt, dass er demjenigen des Puffers entspricht, der zur Herstellung des Proteinrohextraktes (RE) verwendet wurde. So ändert sich der pH-Wert des Proteinrohextraktes während der Fällung nicht.

Um den richtigen Fällungsbereich der HPPR zu ermitteln, wurde zunächst eine fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat-Konzentrationen von 20, 40, 60 und 80 % (V/V) Sättigung durchgeführt.

2.3.10 Synthese von Caffeoyl- und 4-Cumaroyl-CoA

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an Stöckigt und Zenk (1975).

2.3.10.1 Synthese von Caffeoyl- und 4-Cumaroyl-Succinimid-Estern

Die erforderlichen Succinimid-Ester waren bereits von J. Meinhard synthetisiert worden und standen zur Verfügung.

2.3.10.2 Synthese von Caffeooyl- und 4-Cumaroyl-CoA

25,2 mg NaHCO_3 wurden in einem hohen Reagenzglas in 6 ml Aqua dest. gelöst und 15 Minuten mit Stickstoff durchgast. Nachdem 23 mg Coenzym A (freie Säure) zu dieser Lösung gegeben worden waren, wurde die Durchgasung mit Stickstoff wiederholt.

Von den Succinimid-Estern wurden 56 mg in 0,5 – 1 ml Aceton p.a. gelöst und tropfenweise zur CoA-Lösung pipettiert. Hierbei kam es zur Bildung eines Niederschlags, der sich jedoch durch Zugabe weiterer 6 ml Aceton p.a. wieder auflösen ließ. Das Reagenzglas wurde verschlossen, in Aluminiumfolie eingeschlagen und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das organische Lösungsmittel durch Begasen mit Stickstoff vollständig aus der Lösung entfernt. Durch den Volumenverlust kam es zur Eintrübung der Lösung und Ausfällung eines Niederschlags. Die wässrige Lösung wurde in Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (10 min, 16.000 g). Nachdem der erhaltene klare Überstand im Vakuum auf ca. 0,5 ml eingengt worden war, konnte er auf DC-Platten (Cellulose F, 20 x 20 cm, VWR) aufgetragen werden. Die Dünnschicht-Chromatographie erfolgte über Nacht (Laufzeit ca. 15 Stunden, Laufstrecke ca. 18 cm). Als mobile Phase diente eine Mischung aus n-Butanol/Essigsäure/Aqua dest. im Verhältnis 5/2/3.

Nachdem die Platten unter dem Abzug getrocknet waren, konnten die CoA-Ester auf den Celluloseplatten aufgrund ihrer Fluoreszenzlöschung bei 254 nm detektiert und markiert werden (Abb. 20). Die entsprechenden Banden wurden ausgekratzt und das Cellulosepulver so lange mit Aqua dest. eluiert bis im Eluat keine CoA-Ester mehr nachweisbar waren (photometrische Kontrolle). Die vereinigten Eluate wurden im Vakuum getrocknet und in wenig Aqua dest. aufgenommen.

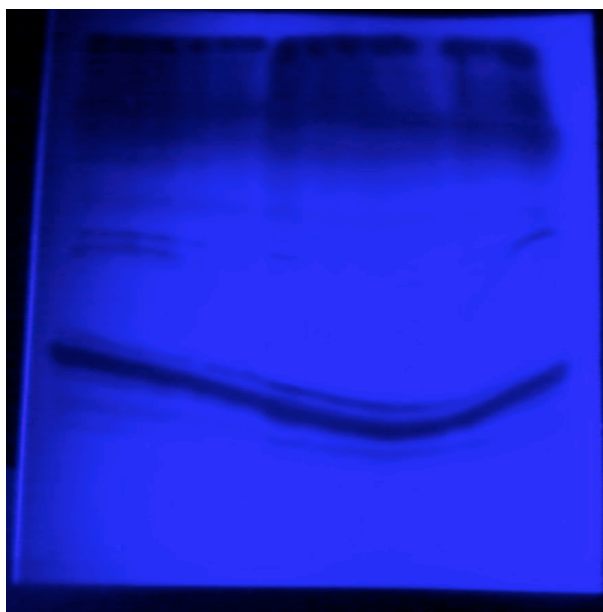


Abb. 20: Reinigung des Caffeooyl-CoA-Ester durch DC ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Die Bande des CoA-Ester ist die kräftige, nicht fluoreszierende Bande in der unteren Hälfte.

Die Reinheit und Konzentration der erhaltenen Produkte lässt sich photometrisch ermitteln:

$$\text{4-Cumaroyl-CoA:} \quad c = \frac{V_f \cdot E}{21} \quad [\text{mM}] \quad \lambda = 334 \text{ nm}$$

$$\text{Caffeoyl-CoA:} \quad c = \frac{V_f \cdot E}{18} \quad [\text{mM}] \quad \lambda = 346 \text{ nm}$$

V_f : Verdünnungsfaktor

E : Extinktion

Die erhaltenen Lösungen der CoA-Ester wurden auf Konzentrationen von 5 mmol/l eingestellt und bei -20°C gelagert.

2.3.11 Gewinnung von DHPL aus Rosmarinsäure

Da Dihydroxyphenyllactat (DHPL), ein Substrat der Rosmarinsäure Synthase, nicht kommerziell erworben werden konnte, musste es durch Hydrolyse aus Rosmarinsäure gewonnen werden.

20 mg Rosmarinsäure wurden mit 200 mg Rhozyme HP 150 in einem Reagenzglas in 10 ml 0,1 M Ammoniumacetat pH 6,0 mit 1 mM Ascorbat gelöst. Das Gemisch wurde 10 Minuten mit Stickstoff begast. Anschließend erfolgte eine 5-stündige Inkubation bei 30°C im Wasserbad. Währenddessen wurde der Inhalt des Reagenzglases durch Einschlagen in Aluminiumfolie vor Licht geschützt.

Da Rhozyme HP 150 eine Esterase enthält, kommt es während dieser Inkubation zur Spaltung der Rosmarinsäure in DHPL und Kaffeesäure.

Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 1 ml 6 N Salzsäure gestoppt.

Durch Ausschütteln mit Ethylacetat sollte das DHPL aus dem Gemisch isoliert werden.

Zuvor wurden 3 ml gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung zum Ansatz gegeben. Ammoniumsulfat erhöht die Ionenstärke und verbessert damit die Phasentrennung während des Ausschüttelns.

Um das DHPL möglichst vollständig zu isolieren, wurde viermal mit 10 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die gesammelten Ethylacetat-Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt.

Nachdem der Rückstand in 0,5 ml Ethanol aufgenommen worden war, wurde er auf eine Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator (F_{254}) aufgetragen. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte mit dem Laufmittel n-Butanol/Essigsäure/ H_2O : 63/10/27.

Nach einer Laufzeit von etwa 15 Stunden und Trocknen der DC-Platte konnte die DHPL-Bande unter UV-Licht markiert und ausgekratzt werden. Das DHPL ließ sich durch mehrmaliges Ausschütteln mit Wasser aus dem Kieselgelpulver eluieren. Zur Anreicherung wurden die vereinigten Eluate konzentriert und in wenig Wasser aufgenommen.

Das Spektrum einer DHPL-haltigen wässrigen Lösung weist ein Maximum bei 280 nm auf. Mit folgender Formel lässt sich aus den Absorptionswerten (E) die Konzentration der DHPL-Lösung errechnen:

$$c = E/2600 \text{ [mol/l]}$$

Die DHPL-Lösung wurde auf eine Konzentration von 10 mmol/l eingestellt und bis zur Verwendung für Enzymtests eingefroren.

2.4 Methoden der Molekularbiologie

2.4.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA (Ribonukleinsäure) aus Zellen der *Melissa officinalis*-Suspensionskultur erfolgte nach einem Verfahren, das sich eng an die von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebene Single Step-Methode anlehnt.

Zunächst war es nötig, Zellen des zweiten oder dritten Kulturtages in flüssigem Stickstoff zu mörsern. 50 mg dieser gefrorenen Zellen wurden in gekühlte Eppendorf-Gefäße (2 ml) eingewogen, mit 500 µl Lösung D versetzt und kurz bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Schütteln inkubiert.

Die Denaturierungslösung D enthält neben 25 mM Natriumcitrat pH 7,0 und 0,7 % Laurylsarcosin auch 4 M Guanidinthiocyanat (GTC). GTC ist ein chaotropes Salz, das Proteine und auch Ribonucleasen (RNasen) sehr effektiv denaturieren und damit inaktivieren kann. Da es sich bei den RNasen um äußerst stabile Enzyme handelt, die die Hydrolyse von Ribonukleinsäuren in kleinere Fragmente katalysieren, steigert GTC die Effizienz der Isolierung.

Dann wurden unter wiederholtem sanftem Mischen 50 µl Natriumacetat pH 4,0, 500 µl Phenol (mit Citrat-Puffer gesättigt) und 100 µl eiskaltes Chloroform zugegeben. Nach 10-sekündigem Schütteln inkubierten die Proben für 15 Minuten auf Eis, ehe Proteine und DNA durch Zentrifugieren (15 Minuten, 12.000 g, 4 °C) abgetrennt werden konnten. 400 µl des wässrigen Überstands, welcher die RNA enthält, wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort mit dem gleichen Volumen eiskaltem Isopropanol gemischt. Nach mindestens 15-minütiger Fällung bei -20 °C konnte die RNA durch eine 10-minütige Zentrifugation mit 12.000 g bei 4 °C pelletiert werden.

Dieses RNA-Pellet wurde zuerst mit 70 % Ethanol p.a., anschließend mit Ethanol p.a. gewaschen. Das Resuspendieren der RNA geschah nach kurzem Trocknen bei 37 °C im 50 °C warmen Wasserbad in 20 µl demineralisiertem, doppelt autoklavierten Wasser.

Abschließend konnte die Qualität der RNA sowie die Abwesenheit von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert werden. Die RNA-Menge wurde photometrisch ermittelt.

2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, die zur Auftrennung von RNA- und DNA-Stücken angewendet wird. Sie kann zur Überprüfung der RNA-Qualität sowie zur Auswertung von PCR-Ergebnissen oder Restriktionsverdauen verwendet werden. Da DNA- und RNA-Stränge aufgrund ihrer Phosphat-Reste negativ geladen sind, bewegen sie sich im elektrischen Feld in Richtung Anode. In einem Agarose-Gel wird diese Wanderung durch Poren begrenzt, die die Moleküle passieren müssen. Die Porengröße wird umso geringer, je höher die Agarose-Konzentration des Gels ist. Dieser Effekt wird zur Auftrennung von Nukleinsäure-Molekülen nach ihrer Größe genutzt.

0,7–2 g Agarose wurden vollständig in 100 ml 0,5x TBE-Puffer gelöst. Hierzu musste der Ansatz in der Mikrowelle erwärmt werden. Die noch flüssige Agarose-Lösung wurde in Gel-Formen gegossen und dort mit Ethidiumbromid gemischt (1 µl 1 % Ethidiumbromid-Lösung/100 ml Agarose-Lösung). Ein Kamm, der in der Lösung steckte, formte später die Taschen, in die Proben und Marker geladen wurden.

Nach vollständigem Erstarren konnte das Gel in eine Elektrophorese-Kammer gelegt und vollständig mit 0,5x TBE-Puffer bedeckt werden.

Die Proben (5-30 µl) mussten mit 5 µl 6x Ladepuffer gemischt und vorsichtig in die Taschen pipettiert werden. Da das im Ladepuffer enthaltene Glycerin eine höhere Dichte als der Elektrophorese-Puffer hat, sorgt es dafür, dass die Proben beim Beladen und zu Beginn der Elektrophorese nicht aus den Taschen diffundieren können. Bromphenolblau und Xylencyanol sind niedermolekulare Farbstoffe, die zum Abschätzen des Fortschritts der Elektrophorese dienen. Zusätzlich wurden 5 µl GeneRuler™ DNA Ladder-mix (Fermentas) auf das Gel aufgetragen. Dieser Größenstandard erlaubt später das Abschätzen der Größe der DNA/RNA-Banden.

An die Elektrophorese-Kammer wurde ein Gleichstrom von 120 V angelegt (12 V/cm).

Die Auswertung der Elektrophorese erfolgte unter UV-Durchlicht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) (Geldokumentationssystem von RS-Laborgeräte). Durch Interkalation mit Ethidiumbromid fluoreszieren Nukleinsäure-Banden bei dieser Wellenlänge orange.

Die DNA-Banden konnten mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und zur weiteren Verwendung aufgereinigt werden.

0,5x TBE-Puffer

45 mM Tris
45 mM Borsäure
1,5 mM Na-EDTA

6x Ladepuffer

0,03 % Bromphenolblau
0,03 % Xylencyanol
10 mM Tris/HCl pH 7,6
60 mM EDTA
60 % Glycerin

2.4.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Oftmals ist es notwendig oder sinnvoll, die Konzentration von DNA oder RNA in einer Lösung zu bestimmen, ehe diese für weitere Reaktionen eingesetzt wird. Schnell und einfach ist dies photometrisch möglich:

Von der zu messenden Probe wurde eine 1+100-Verdünnung erstellt. Diese wurde im Photometer bei drei Wellenlängen vermessen: 230, 260 und 280 nm.

Die gemessenen Werte (E) sollten im Bereich von 0,1 bis 1,0 liegen, um Linearität zu gewährleisten.

$\lambda = 260 \text{ nm}$:

DNA $E \cdot 101 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \cdot 0,05 = c_{\text{DNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$

RNA $E \cdot 101 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \cdot 0,04 = c_{\text{RNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$

$\lambda = 260 \text{ bzw. } 280 \text{ nm}$:

Der Quotient der Messwerte von 260 nm und 280 nm sollte einen Wert von 1,8 – 2,0 haben. Ist er niedriger, deutet er auf Proteine in der Probe hin.

2.4.4 Synthese von cDNA mithilfe des „RevertAid® First Strand cDNA Synthesis Kit“

RNA ist sehr zersetzungsgefährdet, da sie, im Gegensatz zu DNA, an der 2'-Position im Pentosering über eine zusätzliche freie OH-Gruppe verfügt. Diese Hydroxylgruppe ermöglicht nach Hydrolyse des Protons die Bildung von Ringstrukturen, die mit einer Spaltung des RNA-Stranges einhergehen. Da außerdem die Gefahr der Zersetzung der RNA durch die stabilen, weit verbreitet auftretenden RNasen besteht, ist es sinnvoll, RNA möglichst bald in die stabilere cDNA umzuschreiben. Zudem wird für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) cDNA benötigt.

Die Synthese der cDNA aus RNA erfolgte unter Verwendung des „Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Fermentas.

11 μl RNA-Lösung (mit einer Gesamt-RNA-Konzentration von 0,1 – 5 μg) wurden mit 1 μl Oligo (dT)₁₈-Primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt und kurz zentrifugiert. Dann wurde dieser Ansatz fünf Minuten bei 70 °C inkubiert. Durch das Erhitzen lösen sich Sekundärstrukturen der RNA, so dass die Primer einfacher am Poly A-Schwanz der mRNA binden können.

Nachdem die Mischung auf Eis abgekühlt worden war, wurden folgende Lösungen hinzu pipettiert:

4 μl 5 x Puffer

1 μl RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20 U/ μl)

2 μl 10 mM dNTP Mix

Der Ansatz wurde sanft gemischt, erneut zentrifugiert und schließlich 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der von Fermentas vertriebene RNase-Inhibitor RiboLock™ Ribonuclease

Inhibitor verhindert durch nicht-kompetitive Hemmung die Aktivität der RNasen A, B und C und verlängert so die Lebensdauer der RNA im Ansatz. Gleichzeitig kommt es während dieser Inkubation zur Anlagerung der Primer an die RNA.

Durch Zugabe von 1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl) wurde die reverse Transkription der RNA zu cDNA gestartet. Diese findet während der anschließenden 60-minütigen Inkubation bei 42 °C statt. Bei dem Enzym RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase handelt es sich um eine speziell modifizierte Reverse Transkriptase aus dem Moloney murine leukemia virus. Aufgrund der RNase H-Aktivität erkennt sie RNA-DNA-Hybride und schneidet spezifisch nur den RNA-Strang.

Beendet wurde die cDNA-Synthese durch Inaktivierung der Enzyme bei 10-minütigem Erhitzen auf 70 °C.

Die so erhaltene cDNA konnte unmittelbar für PCR verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR), die erstmals 1985 von Saiki et al. beschrieben wurde, kann für viele molekularbiologische Zwecke eingesetzt werden. In dieser Arbeit diente sie der Vervielfältigung von DNA-Stücken, dem Klonieren von Genen, der Herstellung von DIG-markierten Sonden (für Southern Blotting) und dem semiquantitativen Nachweis der Genexpressionen im Kulturverlauf.

Die PCR verläuft in drei Schritten, die bis zu 40-mal wiederholt werden. Theoretisch findet bei jeder Wiederholung eine Verdoppelung der DNA-Moleküle, insgesamt also eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten Produktes, statt.

Der erste Schritt der PCR ist die Denaturierung: Bei 94 °C kommt es zur Trennung der beiden Stränge der Template-DNA.

Als Annealing, den zweiten Schritt, bezeichnet man die Anlagerung (Hybridisierung) der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotid-Primer an das einzelsträngige Template. Die Annealing-Temperatur (T_{An}) ist primerspezifisch und nicht nur abhängig von der Länge der Primer sondern auch von ihrer Nukleotidabfolge. Sofern keine anderen Angaben gemacht werden, wurde die Annealing-Temperatur nach der Methode der Firma Eurofins MWG Operon bestimmt:

Sequenz < 15 Basen:

$$T_{An} [^{\circ}C] = 2(n_A + n_T) + 4(n_G + n_C)$$

Sequenz > 15 Basen:

$$T_{An} [^{\circ}C] = 69,3 + [41(n_G + n_C)/s - (650/s)]$$

n = Anzahl des Nucleotids X

s = Menge aller Nucleotide der Sequenz

Im letzten Schritt wird der Primer in 5'-3'-Richtung durch eine Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) verlängert bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Diese Elongation findet gewöhnlich bei 72 °C statt, da dies dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase entspricht (Innis et al., 1988). Da die Aktivität der Polymerase von Mg²⁺-Ionen abhängig ist, müssen diese in geeigneter Konzentration im PCR-Ansatz vorhanden sein.

2.4.5.1 Amplifikation von DNA-Sequenzen

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

5	µl	5x Puffer
2,5	µl	25 mM MgCl ₂
1	µl	10 mM dNTP-Mix
1	µl	Primer forward (100 pmol/µl)
1	µl	Primer reverse (100 pmol/µl)
2	µl	Template
12,5	µl	Aqua ster.
0,1	µl	GoTaq-Polymerase (5 U/µl)

Als Template diente meist cDNA, welche durch reverse Transkription einer RNA erhalten wurde, die aus *Melissa officinalis*-Suspensionskulturzellen des zweiten, dritten oder vierten Kulturtages isoliert worden war. Seltener wurden genomische DNA, Plasmid-DNA und DNA aus einer früheren PCR eingesetzt.

Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen hat sich folgendes PCR-Programm bewährt:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	2 min
	T _{An}	1 min
	70 °C	2 min
38	94 °C	30 s
	T _{An}	1 min
	70 °C	2 min
1	94 °C	30 s
	T _{An}	2 min
	70 °C	10 min

Nach der PCR wurde ein Aliquot von 10 µl jeden Ansatzes auf einem 0,7 % Agarosegel auf Erfolg überprüft.

2.4.6 RACE-PCR

Ein Ziel dieser Arbeit sollte die Sequenzaufklärung und Expression verschiedener, an der Rosmarinsäure-Biosynthese beteiligter Enzyme sein.

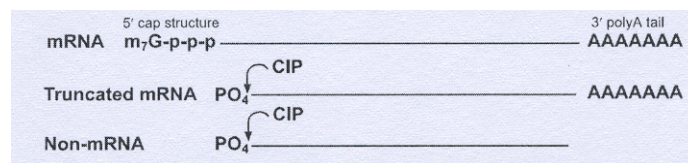
Unter Umständen kann eine Sequenzaufklärung bereits gelingen, wenn die PCR mit Voll-

längenprimern des gleichen Gens einer nahe verwandten Pflanze durchgeführt wird. In vielen Fällen muss jedoch die Methode der RACE-PCR (RACE: rapid amplification of cDNA-ends) (Frohmann, 1993/94) angewandt werden, da sich gerade an den 5'- und 3'-Termini der cDNA häufig variable Bereiche befinden.

Template der RACE-PCR ist eine cDNA, die so modifiziert wurde, dass sowohl 5'- als auch 3'-Ende über bekannte Sequenzen verfügen. Die Firma Invitrogen bietet für diesen Zweck mit dem GeneRacer™ Kit eine geeignete Zusammenstellung an Reagenzien an. Voraussetzung für eine Sequenzaufklärung durch RACE-PCR ist eine bekannte Nukleotidsequenz im Mittelteil des Transkriptes. Von dieser ausgehend kann die volle cDNA-Länge schließlich durch zwei PCR geklärt werden.

Als Ausgangsmaterial diene RNA, die nach der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Methode aus Zellen von drei und vier Tage alten *Melissa officinalis*-Suspensionskulturen gewonnen wurde.

Um sicherzustellen, dass tatsächlich nur Vollängen-RNA mit einem RNA-Oligo ligiert wird, werden im ersten Schritt RNA-Moleküle, denen ein intaktes 5'-Ende (cap-Struktur) fehlt, durch das Enzym calf intestinal phosphatase (CIP) am 5'-Ende dephosphoryliert. Auf intakte RNA hat dieser Schritt keinen Einfluss, da sie durch die cap-Struktur geschützt ist.



In einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß wurden auf Eis pipettiert:

x µl	RNA (≡ 1–5 µg Gesamt-RNA)
1,0 µl	10x CIP-Puffer
1,0 µl	RNase Out™ (40 U/µl)
1,0 µl	CIP (10 U/µl)
7-x µl	DEPC-Wasser

Der Ansatz wurde gemischt und dann zentrifugiert. Nach einstündiger Inkubation bei 50 °C wurde erneut zentrifugiert und schließlich auf Eis abgekühlt.

Es folgte eine RNA-Fällung:

90 µl	DEPC-Wasser
100 µl	Phenol-Chloroform

wurden zum Ansatz gegeben, ehe dieser 30 Sekunden geschüttelt wurde.

Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 16.000 g und Raumtemperatur ließ sich die wässrige, obere Phase (~ 100 µl) in ein neues Eppendorfgefäß überführen.

Hinzu wurden pipettiert:

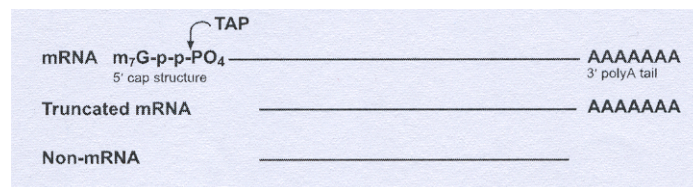
2 µl	10 mg/ml Muschelglycogen
------	--------------------------

10 µl 3 M Na-Acetat pH 5,2

als dieses gut miteinander vermischt war, erfolgte nach Zugabe von
220 µl 95 % Ethanol

und kurzem Mischen die RNA-Fällung bei 10-minütigem Inkubieren in Trockeneis. Die ausgefällte RNA ließ sich durch Zentrifugieren (20 min, 4 °C, 16.000 g) pelletieren. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 7 µl DEPC-Wasser rückgelöst. Weitere RNA-Fällungen wurden auf die gleiche Weise ausgeführt.

Im nächsten Schritt wird mithilfe der tobacco acid pyrophosphatase (TAP) die 5'-CAP-Struktur der mRNA entfernt, die sich an Vollängen-RNA befindet. Übrig bleibt ein Phosphat-Rest, welcher für die Ligation des RNA-Oligo benötigt wird.

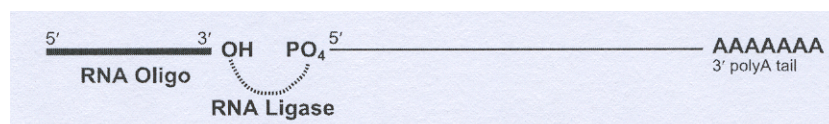


Folgender Ansatz wurde auf Eis pipettiert:

7 µl dephosphorylierte RNA
1 µl 10x TAP Puffer
1 µl RNase Out™ (40 U/µl)
1 µl TAP (0,5 U/µl)

Nach gutem Mischen und Zentrifugieren erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37° C. Schließlich wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt. Es folgte eine weitere RNA-Fällung.

Durch Ligation des GeneRacer™ RNA-Oligo an den 5'-Terminus der RNA wird eine bekannte Sequenz für die GeneRacer™ PCR-Primer eingefügt, mit denen nach Umschreiben der RNA in cDNA eine PCR durchgeführt werden kann.



Für diese Ligation wurden 7 µl entkappte RNA in die vorportionierten Reaktionsgefäße mit GeneRacer™ Oligo (je 0,25 µg) pipettiert und vorsichtig gemischt.

Die Sequenz des GeneRacer™ RNA-Oligo ist 44 Basen lang und lautet:

5'- CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA -3'

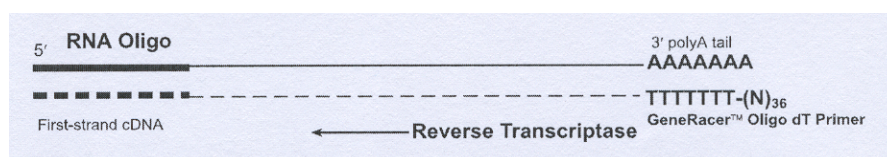
Zum Öffnen der RNA-Sekundärstrukturen war es erforderlich, den Ansatz 5 Minuten bei 65 °C zu erhitzen und dann zwei Minuten auf Eis abzukühlen.

Nach kurzem Zentrifugieren wurden folgende Reagenzien zugegeben:

- 1 µl 10x Ligase Puffer
- 1 µl 10 mM ATP
- 1 µl RNase Out™ (40 U/µl)
- 1 µl T4 RNA-Ligase (5 U/µl)

Die Mischung inkubierte eine Stunde bei 37 °C, ehe sie nach kurzem Zentrifugieren auf Eis abgekühlt wurde. Die anschließende RNA-Fällung erfolgte wie zuvor beschrieben. Am Ende wurde das Pellet in 10 µl DEPC-Wasser rückgelöst.

Durch reverse Transkription der RNA entsteht cDNA mit bekannten Sequenzen am 3'- und 5'-Ende.



Zur cDNA-Synthese wurde das Enzym SuperScript™ III Reverse Transkriptase verwendet. Es handelt sich um eine Reverse Transkriptase aus dem Moloney murine leukemia virus (MMLV-RT), die so modifiziert wurde, dass sie keine intrinsische RNase H-Aktivität mehr besitzt, wodurch sie relativ lange Transkripte ermöglicht.

Zu den 10 µl ligierter RNA wurden pipettiert:

- 1 µl GeneRacer™ Oligo dT Primer
- 1 µl dNTP Mix (je 10 mM)
- 1 µl steriles, destilliertes Wasser

5-minütiges Erhitzen auf 65 °C diente zum Lösen von RNA-Sekundärstrukturen. Nach kurzem Abkühlen auf Eis und Zentrifugieren, wurden hinzugefügt:

- 4 µl 5x First Strand Puffer
- 1 µl 0,1 M DTT
- 1 µl RNase Out™ (40 U/µl)
- 1 µl SuperScript™ III RT (200 U/µl)

Nach Anleitung des Herstellers wurde der Ansatz vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und 30-60 Minuten bei 50 °C inkubiert.

Anschließend musste das Enzym durch 15-minütiges Erhitzen auf 70 °C inaktiviert werden.

Der Ansatz wurde schließlich auf Eis abgekühlt und die Flüssigkeit durch Zentrifugieren am Boden gesammelt.

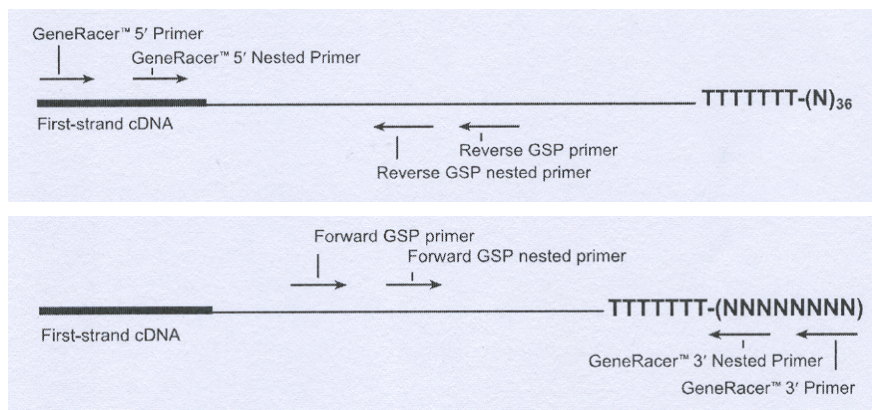
Der abschließende Verdau des RNA-Strangs erfolgte mit

1 µl RNase H (2 U)

bei 20-minütiger Inkubation bei 37 °C.

Die erhaltene cDNA konnte direkt für PCR eingesetzt oder bei –20 °C gelagert werden.

5'- und 3'-Ende der cDNAs wurden in getrennten Ansätzen amplifiziert. Um eindeutige Ergebnisse und bessere Banden auf den Agarose-Gelen zu erzielen, wurde zusätzlich eine zweite PCR mit Primern durchgeführt, die innerhalb der bekannten Sequenzen liegen. Diese Methode wird als nested PCR bezeichnet.



Die von Invitrogen zur Amplifikation des 5'-Endes bereitgestellten Primer haben folgende Sequenzen:

GeneRacer™ 5' Primer

5'- CGA CTG GAG CAC GCG GAC ACT GA –3'

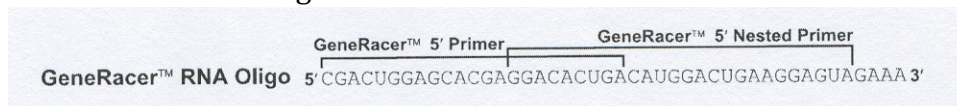
T_{An} : 66 °C

GeneRacer™ 5' Nested Primer

5'- GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA –3'

T_{An} : 64,8 °C

Sie überschneiden sich wie folgt:



Zur PCR des 3'-Endes stellt Invitrogen folgende Primer zur Verfügung:

GeneRacer™ 3' Primer

5'- GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G –3'

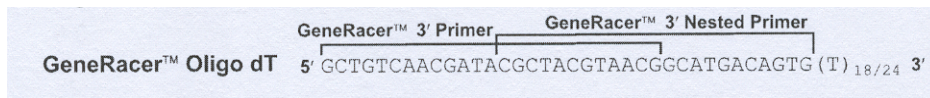
T_{An} : 64,6 °C

GeneRacer™ 3' Nested Primer

5'- CGC TAC GTA ACG GCA TGA CAG TG –3'

T_{An} : 64,2 °C

Die schematische Anordnung sieht so aus:



Zunächst wurde die RACE-PCR pipettiert.

Alle Ansätze enthielten:

- 36 µl Aqua ster.
- 5 µl 10x Expand High Fidelity Puffer
- 3 µl 25 mM MgCl₂
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix
- 0,5 µl RACE-cDNA
- 1,2 µl genspezifischer Primer (100 mM)
- 3 µl GeneRacer™ 5'/3' Primer
- 0,5 µl Expand High Fidelity Enzyme Mix (3,5 U/µl)

Das Expand High Fidelity PCR-System der Firma Roche enthält eine Mischung aus thermostabiler *Taq*-Polymerase und korrekturfähiger Proofreading-Polymerase, die vor Mutationen im PCR-Ansatz schützen soll.

Das PCR-Programm lautete:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	2 min
5	94 °C	30 s
	72 °C	1 min
	94 °C	30 s
25	64 °C	30 s
	72 °C	2 min
1	72 °C	10 min

Die durch diese PCR erhaltenen Produkte konnten unmittelbar als Template in der anschließenden nested PCR eingesetzt werden.

Jeder nested PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

- 2,5 µl 5x Puffer
- 3 µl 25 mM MgCl₂
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix
- 1 µl GeneRacer™ 5'/3' nested Primer
- 1 µl genspezifischer nested-Primer (100 mM)
- 2 µl cDNA der ersten PCR
- 39 µl Aqua ster.
- 0,1 µl GoTaq-Polymerase (5 U/µl)

Für die nested PCR wurde das PCR-Programm verwendet, das sich bereits bei der Amplifikation von DNA-Sequenzen bewährt hat:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	2 min
	T _{An}	1 min
	70 °C	2 min
38	94 °C	30 s
	T _{An}	1 min
	70 °C	2 min
1	94 °C	30 s
	T _{An}	2 min
	70 °C	10 min

An die nested PCR schloss sich eine Gel-Elektrophorese zur Prüfung der Ergebnisse an.

2.4.7 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

Die Aufreinigung von DNA-Amplifikaten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „Nucleo Spin® Extract II Kits“, das von Macherey-Nagel vertrieben wird.

Die zu isolierende DNA-Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Sollte die Reinigung nicht unmittelbar erfolgen, bestand die Möglichkeit, diese DNA einzufrieren oder auf Eis zu lagern.

Zum Aufschmelzen des Agarosegels wurden 200 µl Puffer NT je 100 mg Gel hinzupipettiert und alles 5 bis 10 Minuten unter gelegentlichem sanftem Mischen bei 50 °C inkubiert bis das Gel vollständig gelöst war. Dann wurde der Ansatz auf ein NucleoSpin® Extract II-Säulchen gegeben und 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Das Säulchen enthält eine Silica-Membran, die die DNA bindet. Der Durchfluss wurde verworfen und die Membran mit 600 µl Puffer NT3 gewaschen. Nach dem Zentrifugieren wurde der Durchfluss erneut verworfen und das Säulchen abschließend weitere 2 Minuten zentrifugiert, um sämtliche Puffer-Reste zu entfernen. Zum Eluieren der DNA wurden 20 bis 50 µl autoklaviertes, demineralisiertes Wasser auf die Säule pipettiert. Nach einer kurzen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA in ein steriles 1,5 ml-Eppendorfgefäß zentrifugiert (1 min, 11.000 g).

2.4.8 Ligation in den Vektor pGEM®-T

Die Ligation in den Vektor pGEM®-T (Abb. 149) dient der Vervielfältigung von DNA-Stücken nach PCR, die sequenziert oder in andere Vektoren umklont werden sollen. Ihr Mechanismus entspricht dem der TA-Klonierung (Zhou und Gomez-Sanchez, 2000): Die zur PCR verwendete *Taq*-Polymerase addiert ein zusätzliches AMP an das 3'-Ende des Amplifikates (Clark et al., 1987), der pGEM®-T Vektor hingegen verfügt über einen T-Überhang, so dass Insert und Vektor einfacher ligiert werden können.

In ein steriles 1,5 ml-Eppendorfgefäß wurden pipettiert:

5,0 µl 2x Puffer

0,5 µl	Vektor pGEM®-T (50 ng/µl)
2,5 µl	Insert (PCR-Produkt, direkt aus dem PCR-Ansatz oder vorgereinigt)
1,0 µl	Aqua ster.
1,0 µl	T4-DNA-Ligase (3 Weiss units/µl)

Der Ansatz wurde sanft gemischt und kurz zentrifugiert. Inkubiert wurde wahlweise ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Anschließend erfolgte die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen.

2.4.9 Medien für die Bakterienanzucht

Die Anzucht von Bakterienkulturen erfolgte in LB-Medium (engl. lysogeny broth) (Bertani, 1951).

Zusammensetzung des LB-Mediums:

Trypton/Pepton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

Der pH-Wert des Mediums wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

Das Medium wurde nach Portionierung in Erlenmeyerkolben autoklaviert (20 min, 121 °C, 1 bar Überdruck).

Wurde festes Medium zur Herstellung von Agar-Platten benötigt, so mussten vor dem Autoklavieren 1 % Agar-Agar zum Medium gegeben werden.

2.4.10 Transformation mit Roti®-Transform

2.4.10.1 Kompetente *E. coli*

Im Gegensatz zu *Bacillus subtilis* und mindestens 30 weiteren Bakterienspezies sind *E. coli* nicht in der Lage fremde DNA aufzunehmen (Chen und Dubnau, 2004). Um dies dennoch zu ermöglichen, müssen *E. coli* vorbehandelt, sprich kompetent gemacht werden. Übliche Methoden sind Elektroporation oder die Behandlung mit Salzlösungen (z.B. Calcium- oder Lithiumsalze), die die Durchlässigkeit der Membran verändern.

In unserem Labor wurde das Roti®-Transform System von Roth verwendet, das für alle üblichen *E. coli*-Stämme geeignet ist.

Zunächst wurden 4 ml LB-Medium in einem Reagenzglas mit *E. coli* des gewünschten Stammes (DH5α und JM109 zur Vervielfältigung von DNA, BL21(D3)pLysS und M15[pREP4] zur Expression von Proteinen) inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln (220 UpM) inkubiert. Am nächsten Tag konnten 10 ml LB-Medium in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 1,5 ml dieser Über-Nacht-Kulturen angeimpft werden. Die Bakterien wurden bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer optimalen optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) zwischen 0,4 und 1,0 wachsen gelassen. Diese war nach circa 1,5 Stunden erreicht. Nun wurden die Bakteriensuspensionen zu 1,9 ml in 2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und durch Zentrifugieren (3.000 g, 5 min) pelletiert. Nach-

dem der Überstand verworfen worden war, mussten die Bakterien durch sanftes Schütteln in 100 µl eiskaltem LB-Medium resuspendiert werden. Unter sterilen Bedingungen wurden zu jedem Aliquot 90 µl eiskaltes Roti®-Transform 1 pipettiert. Nach sanftem Mischen wurden 10 µl Roti®-Transform 2 hinzugegeben und der Inhalt der Reaktionsgefäße erneut gemischt. Die nun kompetenten Zellen konnten nach 5-minütiger Inkubation auf Eis direkt für Transformationen verwendet oder für spätere Transformationen eingefroren werden. Die Lagerung kompetenter Zellen ist bei -80 °C über mehrere Monate möglich.

2.4.10.2 Transformation

Zur Transformation der Bakterien mit dem mit der zu klonierenden DNA ligierten Vektor pGEM®-T wurden 5 µl des Ligationsansatzes zu einem Aliquot kompetenter *E. coli* DH5α und JM109 gegeben, kurz gemischt und etwa eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurden die kompetenten Bakterien auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml), 100 µl 0,1 M IPTG und 20 µl X-Gal (50 mg/ml) ausgestrichen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert.

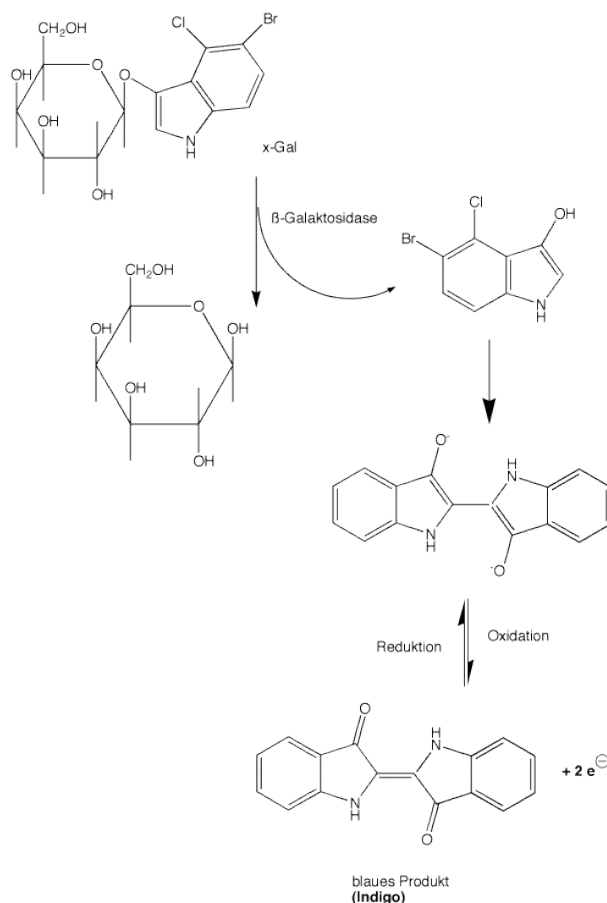


Abb. 21: Reaktion der β-Galaktosidase

Ampicillin verhindert das Wachstum solcher Bakterien, die keinen Vektor aufgenommen hatten, da diese nicht Ampicillin-resistent sind. Das lacZ-Gen des pGEM®-T Vektors er-

möglichst zusätzlich die Selektion positiver Klone durch Blau-Weiß-Screening. Wurde das Insert in den Vektor aufgenommen, ist die codierende Sequenz der β -Galactosidase unterbrochen: Der auf den Agarplatten aufgebrachte Farbstoff X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) kann nicht mehr gespalten werden. Die positiven Kolonien erscheinen weiß. Wurde hingegen kein Insert in den Vektor aufgenommen, sind die Kolonien blau gefärbt, da das Enzym β -Galactosidase exprimiert wird (Jacob und Monod, 1961). Infolgedessen wird Galactose von X-Gal abgespalten und 5-Brom-4-Chlor-3-hydroxyindoxyl wird durch Luftsauerstoff oxidiert und zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo dimerisiert (Abb. 21).

Bei Transformationen mit Vektoren, die kein lacZ-Gen enthalten, konnte auf die Vorbehandlung der LB-Agar-Platten mit IPTG und X-Gal verzichtet werden.

Sollten Plasmide eingeführt werden, die zuvor durch Plasmid-Extraktion isoliert worden waren, war eine erfolgreiche Transformation bereits durch Zugabe von 1 μ l der resuspendierten Plasmide zu den kompetenten Bakterien möglich.

2.4.11 Anlegen von Bakteriendauerkulturen

Nach erfolgreicher Ligation und Transformation wuchsen auf den Agarplatten einzelne Bakterienkolonien. Diese konnten mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in ein steriles Reagenzglas mit 4 ml LB-Medium mit 20 μ l Ampicillin (20 mg/ml) überführt werden. Der Ansatz wurde zur Vermehrung der Bakterien über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln (220 UpM) inkubiert.

Am darauffolgenden Tag können von diesen Über-Nacht-Kulturen Dauerkulturen angelegt werden. Hierzu wurden 425 μ l Bakterienkultur in einem sterilen Reaktionsgefäß mit 75 μ l sterilem Glycerol vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei – 80 °C gelagert.

2.4.12 Plasmid-Extraktion „Quick and Dirty“ nach Birnboim und Doly

Um nach der Ligation zu prüfen, ob tatsächlich das gewünschte DNA in den Vektor aufgenommen wurde, muss das Plasmid wieder aus dem Bakterium isoliert und die einligierte DNA herausgeschnitten werden.

Diese Plasmid-Extraktion erfolgte nach einem Verfahren, das sich eng an die von Birnboim und Doly (1979) beschriebene alkalische Extraktion anlehnt.

Von einer Übernachtskultur wurden zunächst zweimal 1,5 ml Bakteriensuspension steril abgenommen und durch Zentrifugation (3.000 g, 5 min) pelletiert. Die hierbei erhaltenen Bakterienpellets wurden in 300 μ l P1 (0,05 M Tris-Puffer pH 8,0 mit 12,5 mM EDTA und 100 μ g/ml RNase A) resuspendiert. Durch die RNase A wird bereits in diesem ersten Schritt niedermolekulare RNA abgebaut, die später aufgrund ihrer geringen Größe nicht ausgefällt werden könnte.

Anschließend wurden 300 μ l P2 (0,2 M NaOH mit 1 % (W/V) SDS) zur Bakteriensuspension gegeben, sanft gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei

kommt es in der stark basischen Lösung durch das Detergenz SDS (Natrium-Dodecylsulfat) zur Lyse der Bakterienmembran und zur selektiven Denaturierung der chromosomalen DNA.

Durch Mischen mit 300 µl eiskaltem P3 (3 M Essigsäure/Kaliumacetat-Puffer pH 5,5) wurde der Ansatz neutralisiert. Während der 5-minütigen Inkubation auf Eis renaturiert die chromosomale DNA und aggregiert zu unlöslichen Verbänden, die durch Zentrifugation (15 min, 16.000 g) abgetrennt werden konnten. Gleichzeitig kommt es durch die hohe Kaliumacetat-Konzentration zur Ausfällung von Protein-SDS-Komplexen und hochmolekularer RNA, die ebenfalls im Sediment zurückbleiben.

Etwa 800 µl des Überstandes, welcher die Plasmid-DNA enthält, wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 80 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 560 µl Isopropanol sanft gemischt und 30 Minuten bei 16.000 g zentrifugiert. Das Pellet, das aus Plasmid-DNA, Proteinen und Salzen besteht, wurde vorsichtig vom Überstand befreit, mit Ethanol p.a. gewaschen, luftgetrocknet und in 20 bis 50 µl sterilem, demineralisiertem Wasser rückgelöst.

2.4.13 Aufreinigung von Plasmiden mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

Für eine Sequenzanalyse wird DNA mit größerer Reinheit benötigt. Diese kann erhalten werden, indem Plasmide über Silica-Säulchen aufgereinigt werden. QIAGEN vertreibt zu diesem Zweck das sogenannte QIAprep® Spin Miniprep Kit, welches in unserem Labor verwendet wurde.

Auch hierfür wurden zunächst zweimal 1,5 ml Bakterienkultur durch Zentrifugieren (5 min, 3.000 g) pelletiert, in 250 µl P1 resuspendiert und mit 250 µl P2 sanft gemischt. Nach Zugabe von 350 µl N3 und unmittelbarem Mischen des Ansatzes erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 16.000 g. Die von Qiagen bereitgestellte Lösung N3 enthält Guanidinhydrochlorid, ein chaotropes Salz, das Denaturierung und Ausfällung von Proteinen bewirkt.

Der Überstand, welcher die Plasmid-DNA enthält, wurde auf ein QIAprep Spin Säulchen übertragen und durch dieses hindurch zentrifugiert (1 min, 16.000 g). Hierbei kommt es zur Bindung der Plasmid-DNA an der Silica-Membran des Säulchens. Nach Entfernung des Durchflusses wurde das Säulchen zunächst mit 0,5 ml PB-Puffer und abschließend mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen. Der Durchfluss musste jeweils nach der Zentrifugation entfernt werden. Ehe die Plasmid-DNA vom Säulchen eluiert wurde, sollte ein letztes Mal für eine Minute zentrifugiert werden, um Waschpuffer-Reste zu entfernen. Zur Elution wurde die QIAprep Säule in ein sauberes, steriles Reaktionsgefäß gestellt, die Membran mit 50 µl demineralisiertem, autoklaviertem Wasser beladen, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich eine Minute zentrifugiert. Die so erhaltene Plasmid-DNA konnte unmittelbar zur Weiterarbeit verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

2.4.14 Restriktionsverdau

Die Frage, ob eine Ligation erfolgreich war, lässt sich nur eindeutig beantworten, indem der Vektor aus den Bakterien isoliert, sein Insert durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten und durch Gelelektrophorese auf die korrekte Größe geprüft wird.

Der Ansatz eines Restriktionsverdaus hatte folgende Zusammensetzung:

2 µl	10x Puffer
0,5 µl	Restriktionsenzym I (10 U/µl)
0,5 µl	Restriktionsenzym II (10 U/µl)
12 µl	Aqua ster.
5 µl	isoliertes Plasmid

Die Komponenten wurden sanft gemischt, kurz zentrifugiert und bis zur Gelelektrophorese mindestens 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Sämtliche Restriktionsverdaue wurden mit Enzymen der Firma Fermentas in den empfohlenen Puffersystemen angesetzt.

Zur Restriktionsanalyse in pGEM®-T ligierter DNA-Amplifikate wurden folgende Enzyme beliebig miteinander kombiniert:

Restriktionsenzym I	Restriktionsenzym II
<i>NcoI</i>	<i>SpeI</i> (<i>BcuI</i>)
<i>SacII</i> (<i>Cfr42I</i>)	<i>PstI</i>
	<i>NdeI</i>

Handelte es sich um die Ligation einer Volllängensequenz, wurde mit dem Enzym oder den Enzymen verdaut, deren Schnittstellen in den Volllängenprimern integriert waren.

2.4.15 Sequenzierung von DNA-Amplifikaten

Die Sequenzierung von DNA-Amplifikaten erfolgte durch Eurofins MWG Operon in Ebersberg, Deutschland.

2.5 Klonierung der an der Biosynthese der Rosmarinsäure beteiligten Gene für PAL, 4CL und RAS

2.5.1 Klonierung der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)

Um die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) zu klonieren, wurden in einem ersten Schritt durch Vergleich der bereits bekannten PAL-Sequenzen von *Agastache rugosa*

(Lamiaceae) (AF326116.1) (Kim et al., unveröffentlicht), *Lithospermum erythrorhizon* (Boraginaceae) (D83075.1) (Yazaki et al., 1997), *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) (AK324736.1) (Aoki et al., 2009) und *Camellia sinensis* (Theaceae) (D26596.1) (Matsumoto et al., 1994) hochkonservierte Regionen ermittelt, aus denen degenerierte Primer abgeleitet werden konnten, die ein Stück von etwa 1450 Basen flankierten.

CW-PALv T_{An}: 62,4 °C
 5'- GC(CT) AG(CT) AG(CT) GA(CT) TGG GTT ATG GA -3'

CW-PALh T_{An}: 61 °C
 5'- CT(CT) A(AG)(CT) TT(CT) TGC ATC C(AG)(AGCT) GGG TAG -3'

Zur erfolgreichen Amplifikation dieser Sequenz musste die Magnesium-Konzentration des Standard-Ansatzes erhöht werden. Die besten Resultate wurden mit folgendem Ansatz erreicht:

5	µl	5x Puffer
3,5	µl	25 mM MgCl ₂
1	µl	10 mM dNTP-Mix
1	µl	sense-Primer (100 pmol/µl)
1	µl	antisense-Primer (100 pmol/µl)
2	µl	cDNA
11,5	µl	Aqua ster.
0,1	µl	GoTaq-Polymerase (5 U/µl)

Optimale Annealing-Bedingungen boten sich im Temperaturbereich von 54,7 – 60,1 °C.

Da die cDNA-Volllänge der 4CL durch RACE-PCR aufgeklärt werden konnte und noch RACE-cDNA zur Verfügung stand, sollte zur Klonierung der PAL ebenfalls diese Methode angewandt werden.

Auf Basis des bekannten Mittelstücks wurden Primer gestaltet, die in PCR und nested PCR mit den GeneRacer™-Primern wie folgt kombiniert wurden:

„5'-RACE“:

GeneRacer™ 5'-Primer mit
 Mo-PAL-5 5'- CAT CTT GGT GGC GGT GCG GAT G – 3' T_{An}: 65,8 °C
 erwartete Sequenzlänge: ca. 1140 bp

„3'-RACE“:

GeneRacer™ 3'-Primer mit
 Mo-PAL-3 5'- GCC GCA CAC GGC AAC AAG AG– 3' T_{An}: 63,5 °C
 erwartete Sequenzlänge: ca. 1700 bp

„5' nested RACE“:

GeneRacer™ 5' Nested Primer mit

Mo-PAL-5'n 5'- GAT GTG CGG AGG GCA TAT CTG TC- 3' T_{An}: 64,2 °C

erwartete Sequenzlänge: ca. 1070 bp

„3' nested RACE“:

GeneRacer™ 3' Nested Primer mit

Mo-PAL-3'n 5'- CGG CAA TGT TGG TGC GGA TCA AC - 3' T_{An}: 62,4 °C

erwartete Sequenzlänge: ca. 1680 bp

Für die nested PCR wurden Annealing-Temperaturen von 57,2 °C, 59,4 °C und 61,5 °C gewählt.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Nach erfolgreicher Klonierung in pGEM®-T konnten Plasmide isoliert werden, die zur Sequenzaufklärung an Eurofins MWG Operon geschickt wurden. Aufgrund der Länge der Amplifikate waren mehrere Sequenzierungen nötig, um die PAL-cDNA komplett zu erfassen.

Zur Klonierung in pET-15b (Abb. 152 und 153) konnte nur ein Restriktionsenzym, nämlich *NdeI*, verwendet werden. Aus der Vollängensequenz ließen sich folgende Primer ableiten:

Mo-PAL-VL5 mit *NdeI*-Schnittstelle

T_{An}: 65,9 °C

5'- ATT ACA TAT GGA GAG CAT GAA CAA AGG AAC TGA C - 3'

Mo-PAL-VL3 mit *NdeI*-Schnittstelle

T_{An}: 68,2 °C

5'- TAT ACA TAT GCT AGC AGA TAG GCA GAG GTG CAC - 3'

Weder durch mannigfaltige Variation des PCR-Ansatzes und der PCR-Bedingungen noch durch Verwendung diverser cDNAs konnte bei Kombination dieser Primer eine Sequenz amplifiziert werden.

Die Tatsache, dass nur durch Kombination des Primers Mo-PAL-VL5 mit CW-PALh ein PCR-Produkt geeigneter Größe (1750 bp) erhalten wurde, jedoch keines durch Kombination von CW-PALv mit Mo-PAL-VL3, veranlasste die kritischen Überprüfung des 3'-Terminus. Jedoch konnte die Sequenz am 3'-Terminus der PAL-cDNA durch eine Wiederholung von 3'-RACE und 3'nested RACE einwandfrei bestätigt werden.

Ebenso kritische Prüfung des 5'-Terminus lieferte eine weitere, bislang unbeachtete Anfangssequenz, auf deren Basis folgender Primer basiert:

Mo-PAL-5'VL mit *NdeI*-Schnittstelle

T_{An}: 67 °C

5'- ATA CAT ATG GCA GAG AAC GGT CAT CAT GAT TTC - 3'

Dass ebenfalls ein neuer antisense-Primer gestaltet wurde, hing mit der hohen Annealing-Temperatur des sense-Primers zusammen:

Mo-PAL-3'VL mit *NdeI*-Schnittstelle

T_{An} : 70 °C

5'- ATA CAT ATG CTA GCA GAT AGG CAG AGG TGC ACC ATT C - 3'

Das PCR-Programm zur Vervielfältigung der Vollängen-cDNA sah Annealing-Temperaturen von 59,1 °C, 61,8 ° und 64,2 °C sowie, aufgrund der Länge des Amplifikates, eine Elongationszeit von mindestens 2 Minuten vor.

Die aus dem Agarosegel extrahierte DNA wurde zur Vervielfältigung in pGEM®-T zwischenkloniert und schließlich in pET-15b ligiert.

Wenn nur eine Schnittstelle der Multiple Cloning Site (MCS) eines Vektors zur Ligation genutzt wird, besteht die Möglichkeit, dass die gewünschte DNA nicht nur in sondern auch entgegen der Leserichtung ligiert wird. Daher muss durch einen Kontrollverdau nicht nur die Integrität des Inserts, sondern auch seine Leserichtung geprüft werden. Dies ist möglich, indem mit einem Enzym verdaut wird, das einerseits in der MCS des Vektors schneidet, aber auch im Insert. Aus der Größe der ausgeschnittenen Bande kann auf die Ligationsrichtung geschlossen werden. Im Falle der PAL bot sich für diese Zwecke ein Verdau durch *XhoI* an. Befindet sich die PAL-Sequenz in Leserichtung im Vektor schneidet *XhoI* ein Stück von 1900 Basen heraus, wurde die Sequenz entgegen der Leserichtung ligiert, lediglich ein Stück von etwa 200 Basen.

Da die Expression der PAL im Vektor pET-15b erfolglos blieb, wurde als Alternative der Expressionsvektor pQE70 (QIAGEN) (Abb. 154) gewählt, da Song und Wang 2009 eine PAL aus *Salvia miltiorrhiza* erfolgreich in einem pQE-Vektor (pQE30) kloniert hatten.

PAL-Mo5-pQE mit *BglII*-Schnittstelle

T_{An} : 65,4 °C

5'- ATA GAT CTA TGG CAG CGC CAG GTC ATC CTG - 3'

PAL-Mo3-pQE mit *BglII*-Schnittstelle

T_{An} : 66,6 °C

5'- ATA GAT CTG CAG ATA GGC AGA GGT GCA C - 3'

Die Amplifikation gelang bei Annealing-Temperaturen zwischen 54,5 °C und 62 °C und Elongationszeiten von mindestens 2,5 Minuten mit dem bewährten PCR-Programm.

Die korrekte Leserichtung des Inserts wurde im pQE70-Vektor durch Verdau mit *BamHI* und *SacII* bestätigt.

Im *E. coli*-Stamm M15[pREP4] konnte die PAL erfolgreich kloniert und exprimiert werden.

2.5.2 Klonieren der Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL)

Da die Charakterisierung der Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL) im Proteinrohextrakt mit großen Schwierigkeiten verbunden war und viele Versuche ohne auswertbare Ergebnisse blieben, wurde entschieden, eine 4CL zu klonieren und vergleichend zu charakterisieren.

Weil die cDNA-Sequenzen der 4CL vieler Pflanzen bereits bekannt sind, war es möglich, durch Sequenzvergleich hochkonservierte Regionen zu identifizieren und passende Primer für diese Bereiche zu gestalten. Geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Sequenzen konnten durch die Synthese degenerierter Oligonukleotide berücksichtigt werden.

Insgesamt wurden vier Primer synthetisiert, die vier Kombinationsmöglichkeiten boten. Die Sequenzen der sense-Primer lauteten:

CW-4CL-1-Pet T_{An}: 64,3 °C
 5'- GG(AGC) AC(AGCT) AC(AGCT) GG(AG) (CT)T(AGT) CC(AGC) AA(AG) G -3'

CW-4CL-Nv T_{An}: 56 °C
 5'- GC(AGT) CA(AG) CA(AG) GT(AGCT) GA(CT) GG -3'

Als antisense-Primer wurden ausgewählt:

CW-4CL-2-Pet T_{An}: 65,8 °C
 5'- GC(ACT) AC(ACT) GG(AGCT) AC(CT) TC(AT) CC(AGCT) GC -3'

CW-4CL-Nr T_{An}: 55,6 °C
 5'- CC(AGT) GT(AG) TG(AGCT) A(AG)C CA(ACT) CC -3'

Die Amplifikation gelang mit folgendem PCR-Ansatz:

5	µl	5x Puffer
2,5	µl	25 mM MgCl ₂
0,5	µl	10 mM dNTP-Mix
0,5	µl	sense-Primer (100 pmol/µl)
0,5	µl	antisense-Primer (100 pmol/µl)
1	µl	cDNA
15	µl	Aqua ster.
0,1	µl	GoTaq-Polymerase (5 U/µl)

durch Kombinationen folgender Primer:

		T _{An} :	Sequenzlänge:
CW-4CL-1-Pet	CW-4CL-2-Pet	54,1°C / 55,4 °C	875 bp
CW-4CL-1-Pet	CW-4CL-Nr	49 °C / 51,8 °C	685 bp
CW-4CL-Nv	CW-4CL-2-Pet	49 °C / 51,8 °C	815 bp

mit diesem PCR-Programm:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	2,5 min
38	94 °C	30 s
	T _{An}	1 min
	70 °C	2 min
1	70 °C	5 min

Da letztlich nur die Klonierung des von CW-4CL-1-Pet und CW-4CL-Nr flankierten Abschnittes erfolgreich war, erbrachte die anschließende Sequenzierung ein Stück von 685 Basen, das bis zu 88 % Homologie mit anderen 4CL aufwies.

Zur Vervollständigung der cDNA wurde die Methode der RACE-PCR gewählt.
In der ersten PCR wurden folgende Primer kombiniert:

„5'RACE“:

GeneRacer™ 5'Primer mit
4CL-GSP-3' 5'- CCT GTG TGT AGC CAT CCG TCA TGG T – 3' T_{An}: 66,3 °C

„3'RACE“:

GeneRacer™ 3'Primer mit
4CL-GSP-5' 5'- GCA GCA GGT CGA CGG AGA GAA TCC – 3' T_{An}: 67,8 °C

Die nested-PCR enthielten folgende Primerpaare:

„5' nested RACE“

GeneRacer™ 5' Nested Primer mit
4CL-GSP-3'n 5'- CCG TCA TGG TCT ATG GTC CTC TTT G – 3' T_{An}: 66,3 °C
erwartete Sequenzlänge: ca. 900 bp

„3' nested RACE“

GeneRacer™ 3' Nested Primer mit
4CL-GSP-5'n 5'- GGC GGC GAT CTT GAT CAT GCA GAA – 3' T_{An}: 64,4 °C

Die erwartete Sequenzlänge lag bei ca. 1250 bp.

Um deutlich definierte Banden zu erhalten, musste der unter „RACE PCR“ (Kap. 2.4.6) beschriebene, allgemeine Ansatz der nested-PCR ein wenig verändert werden:

	5' nested RACE	3' nested RACE
5x Puffer	5 µl	5 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl	4 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl	1 µl
Kit-nested-Primer (100 pmol/µl)	1 µl	1 µl
4CL-Primer (100 pmol/µl)	1 µl	1 µl

cDNA der ersten PCR	2 µl	2 µl
Aqua ster.	38 µl	36 µl
GoTaq-Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl	0,15 µl
T _{An} :	49,8 °C	50 °C
	53,1 °C	51,4 °C
		54 °C

Die aus dem Agarosegel ausgeschnittenen und aufgereinigten PCR-Produkte wurden schließlich in den pGEM®-T Vektor ligiert und in *E. coli* JM109 und DH5α transferiert. Nach erfolgreicher Klonierung konnten die Sequenzen des 5'-Endes und des 3'-Endes bestimmt werden. Da die einzelnen Sequenzen partiell überlappten, war es möglich, die volle Länge der cDNA zu ermitteln.

Nachdem die Volllängensequenz bekannt war, mussten neue Primer generiert werden. Geplant war eine Überexpression des Enzyms im Vektor pET-15b (Novagen). Dieser pET-Vektor enthält in seiner Multiple Cloning Site (MCS) Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Nde*I, *Xho*I und *Bam*HI, von denen *Nde*I und *Bam*HI ausgewählt wurden, da sie nicht in der 4CL-Volllängensequenz schneiden.

4CL-VL-f mit *Nde*I-Schnittstelle T_{An}: 68,1 °C
 5'- ATT ACA TAT GGA CCC GGC AGG CCA AG - 3'

4CL-VL-rc mit *Bam*HI-Schnittstelle T_{An}: 69,5 °C
 5'- TAG GAT CCT CAT TAG ACT GCA GCT GCT AAT CTT GAT C-3'

Bei Annealing-Temperaturen von 64,1 °C, 65,5 °C und 66,9 °C konnte die Volllängen-cDNA amplifiziert und nach Vermehrung im Vektor pGEM®-T erfolgreich in pET-15b ligiert werden. Zur Überexpression wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS gewählt. Obwohl Mutationen in der Sequenz ausgeschlossen werden konnten, blieb die Expression erfolglos.

Da Zhao et al. (2006) die Überexpression einer 4CL aus *Salvia miltiorrhiza* im Vektor pRSET C (Abb. 150 und 151) gelang und Rohde (mündliche Mitteilung) ebenfalls von einer erfolgreichen Expression einer 4CL in diesem Vektor berichtete, wurden Primer zum Klonieren in diesen Vektor bestellt.

Mo-4CL-VLf2 mit *Bam*HI-Schnittstelle T_{An}: 69,5 °C
 5'- TAG GAT CCA TGG AGA ACC CGG CAG GC -3'

Mo-4CL-VLr2 mit *Eco*RI-Schnittstelle T_{An}: 64,2 °C
 5'- TAG AAT TCT TAG ACT GCA GCT GCT AAT CTT G -3'

Die PCR erbrachte bei Annealing-Temperaturen von 57,3 °C, 60,5 °C und 62,2 °C gute Ergebnisse.

Als trotz diverser Variationen des Ligationsansatzes und wiederholtem Restriktionsverdau von cDNA-Sequenz und Vektor die Ligation erfolglos blieb, wurden zwei andere Schnittstellen der MCS ausgewählt.

4CLr-*NcoI* mit *NcoI*-Schnittstelle T_{An} : 70,7 °C
 5'- GCC CAT GGT TAG ACT GCA GCT GCT AAT CTT GAT -3'

4CLrc-*XhoI* mit *XhoI*-Schnittstelle T_{An} : 69,5 °C
 5'- TAC TCG AGA TGG AGA ACC CGG CAG GC -3'

Die Amplifizierung der Vollängen-cDNA fand erfolgreich bei Annealing-Temperaturen von 60,5 °C, 62,2 °C und 63,7 °C statt. Endlich gelang, nach Vervielfältigung der Sequenz im Vektor pGEM®-T, auch die Ligation in den pRSET C-Vektor. Mit Hilfe des Expressionsstammes BL21(DE3)pLysS konnte das Enzym produziert werden.

2.5.3 Klonierung der Rosmarinsäure Synthase (RAS)

Da die Rosmarinsäure Synthase (RAS) eines der wenigen spezifischen Enzyme des Rosmarinsäure-Synthesewegs ist, ist ihre Sequenz von besonderem Interesse. Nachdem Petersen im Jahr 2006 mit der Klonierung der *Coleus blumei*-RAS, die erste Sequenzaufklärung des RAS-Gens gelungen war, standen Primer für eine cDNA-Vollängensequenz zur Verfügung:

RAS-VL5-CB mit *NdeI*-Schnittstelle T_{An} : 59,5 °C
 5'- ATT ACA TAT GAA GAT AGA AGT CAA AGA CTC -3'

RAS-VL3-CB = RAS VL 3'rc mit *BamHI*-Schnittstelle T_{An} : 64,8 °C
 5'- TAG GAT CCT CAT CAA ATC TCA TAA AAC AAC TTC TC-3'

PCR-Produkte erwarteter Größe wurden bei Annealing-Temperaturen von 52,7 °C und 56,8 °C amplifiziert, aus dem Agarosegel extrahiert und in pGEM®-T kloniert. Aus dem Ergebnis der Sequenzierung konnte die RAS-cDNA-Vollängensequenz der Melisse abgeleitet werden.

Veränderung im Bereich des 5'-Terminus veranlassten zur Gestaltung eines neuen Primers:

RAS VLn (Petersen) mit *BamHI*-Schnittstelle T_{An} : 66,8 °C
 5'- TTG GAT CCA TGA GGA TCG ATA TCA AGG ACT C -3'

Um zu prüfen, ob es auch Sequenzunterschiede im Bereich des RAS-3'-Terminus zwischen *Coleus blumei* und *Melissa officinalis* gibt, wurde eine PCR durchgeführt, die folgendes Primerpaar enthielt: GeneRacer™ 3'Primer und RAS VL 3'rc. Die Annealing-Temperaturen wurden zwischen 55 °C und 59 °C gewählt.

Sequenzierung des in pGEM®-T klonierten PCR-Produktes bestätigte die bereits zuvor ermittelte cDNA-Volllängen-Sequenz.

Durch Kombination der Primer RAS VLn und RAS VL 3'rc wurde bei Annealing-Temperaturen zwischen 50,7 °C und 56,8 °C die RAS-cDNA vervielfältigt. Um die Gefahr von Mutationen während der Elongationsphase der PCR zu verringern, erfolgte die Amplifikation mit dem High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas). Dieser enthält eine *Pfu*-Polymerase mit proof-reading Aktivität, die in der Lage ist, Fehler zu korrigieren, die während der Transkription auftreten.

Der PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

2,5	µl	10x Puffer mit 15 mM MgCl ₂
1	µl	10 mM dNTP-Mix
1	µl	sense-Primer (100 pmol/µl)
1	µl	antisense-Primer (100 pmol/µl)
2	µl	cDNA
52,5	µl	Aqua ster.
0,75	µl	High Fidelity PCR Enzyme Mix (5 U/µl)

Da die Transkriptionsgeschwindigkeit der *Pfu*-Polymerase geringer als diejenige der GoTaq ist, musste das übliche PCR-Programm wie folgt verändert werden:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	2 min
	55 +/- 5 °C	1 min
	70 °C	2,5 min
39	94 °C	30 s
	55 +/- 5 °C	1 min
	70 °C	2,5 min
1	94 °C	30 s
	55 +/- 5 °C	2 min
	70 °C	10 min

Diese Volllängen-cDNA konnte nach Ligation in pGEM®-T in Bakterien vermehrt und in den Vektor pET-15b umligiert werden. Nach Transformation von *E. coli* BL21(D3)pLysS mit dem RAS-haltigen Vektor wurde die cDNA exprimiert und das RAS-Protein produziert.

2.5.4 Anzucht und Induktion rekombinanter Mikroorganismen

Die Anzucht der rekombinanten *E. coli* erfolgte in LB-Medium (Kap. 2.4.9). Durch die Zugabe von Antibiotika sollte vermieden werden, dass sich im Medium auch solche Bakterien vermehren, die das Expressionskonstrukt, d.h. den Expressionsvektor mit einligierter DNA, nicht oder nicht mehr enthalten.

	Expressionsvektor	<i>E. coli</i> Expressionsstamm	Selektions-Antibiotikum
PAL	pQE70	M15[pREP4]	Ampicillin (100 µg/ml) Kanamycin (25 µg/ml)
4CL	pRSET C	BL21(DE3)pLysS	Ampicillin (100 µg/ml)
RAS	pET-15b	BL21(DE3)pLysS	Ampicillin (100 µg/ml)

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Expressionsvektoren, *E. coli*-Expressionsstämme und benötigten Selektions-Antibiotika für die Klonierung der Enzyme PAL, 4CL und RAS

In einem Reagenzglas mit Deckel wurden 4 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit *E. coli* angeimpft, die das gewünschte Expressionskonstrukt enthalten (Tab. 3). Diese Über-Nacht-Kultur wurde etwa 16 Stunden unter ständigem Schütteln (220 UpM) bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde antibiotikumhaltiges LB-Medium mit dieser Bakterien-suspension inokuliert (1,5 ml Über-Nacht-Kultur/100 ml LB-Medium) und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 1,0 wachsen gelassen.

Die Expression des klonierten Gens unterliegt der Kontrolle eines Promotors, der sich ebenfalls auf dem Expressionsvektor befindet. Während der Wachstumsphase der Bakterien wird durch Bindung des lac Repressors an den Promotor die Transkription des Gens verhindert. Durch die Zugabe von 1 ml 0,1 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) kann die Genexpression induziert werden: Indem IPTG an den lac Repressor bindet, ändert sich dessen Konformation, so dass eine Bindung an den Promotor nicht länger möglich ist. Das klonierte Gen kann exprimiert werden.

Die induzierten Bakterien inkubierten weitere 5 Stunden bei 37 °C unter Schütteln, ehe sie durch Zentrifugieren (5 min, 5.000 g, 4 °C) geerntet wurden.

2.5.5 Gewinnung des Proteinrohextraktes aus Bakterien

Nach der Ernte wurden die Bakterienpellets zunächst bei -80 °C eingefroren und vor dem Aufschluss vorsichtig auf Eis aufgetaut. Das Gewicht der Pellets konnte durch Wiegen ermittelt werden. Je nachdem, ob eine Aufreinigung des Enzyms durch Affinitätschromatographie (Kapitel 2.5.6) geplant war oder Enzymtests mit dem Rohextrakt durchgeführt werden sollten, wurden die Pellets entweder in Bindepuffer oder direkt in dem Puffer, der auch in den Enzymtests verwendet wird (PAL: Borsäure-Borax-Puffer pH 8,8; 4CL: 0,1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄-Puffer pH 7,5; RAS: 0,1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄-Puffer pH 7,0), resuspendiert. Üblich waren 2–5 ml Puffer/g Pellet.

Der Aufschluss erfolgte auf Eis mit einem Ultraschallprozessor (Amplitude 0,3, 100 %) über dreimal 30 Sekunden. Dazwischen wurde jeweils 30 Sekunden gekühlt. Abschlie-

ßend wurde der Rohextrakt, der die Enzyme enthält, durch Zentrifugieren (10 Minuten, 10.000 g, 4 °C) vom Sediment abgetrennt.

2.5.6 Reinigung rekombinanter Proteine durch Affinitätschromatographie

In den 1980er Jahren entwickelte die Firma Roche® ein System, mit dessen Hilfe rekombinant exprimierte Proteine schnell und einfach aufgereinigt werden können. Durch eine geringfügige genetische Modifikation wird einem heterolog exprimierten Protein ein sogenannter His-Tag® angefügt, der die Reinigung durch Affinitätschromatographie ermöglicht (Hochuli et al., 1987). Bei diesem Polyhistidin-Tag handelt es sich um ein Aminosäure-Motiv, das aus mindestens 6 hintereinander liegenden Histidin-Molekülen besteht, die wahlweise am N- oder C-Terminus an das Protein gehängt werden können. Praktisch geschieht dies entweder durch PCR oder durch Wahl eines geeigneten Vektors, welcher den 6xHis-Tag direkt bei der Expression an das Protein addiert. Letztere Methode wird auch als Genfusion bezeichnet: Protein und Tag werden in einem gemeinsamen offenen Leseraster kodiert. Entsprechende Vektoren sind kommerziell erhältlich und wurden zur Expression der rekombinanten Enzyme PAL, 4CL und RAS verwendet.

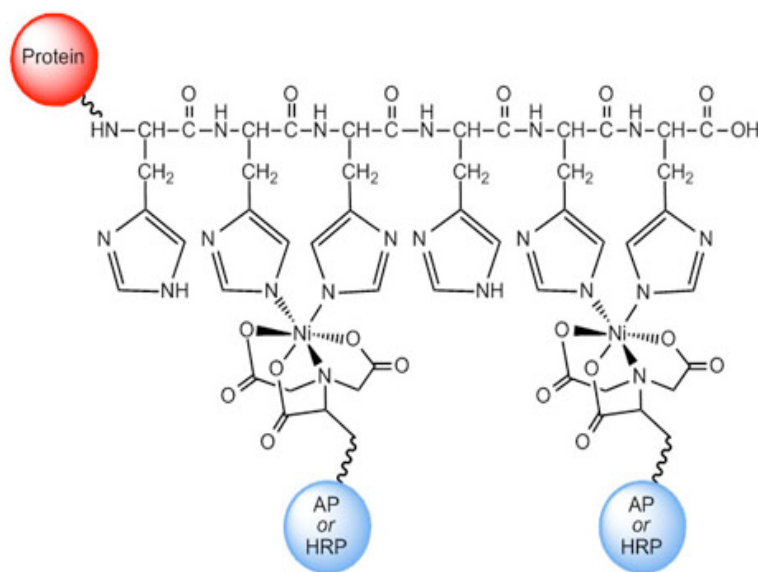


Abb. 22: Affinitätschromatographie durch 6xHisTag

Soll ein rekombinantes Protein durch Affinitätschromatographie gereinigt werden, wird der bakterielle Proteinrohextrakt zunächst mit einer Gel-Matrix gemischt. In diesem Gel sind Metall-Ionen (Ni²⁺ oder Cu²⁺) gebunden, an die der Polyhistidin-Tag mit mikromolarer Affinität bindet (Abb. 22). Durch einen oder mehrere Waschschrte werden weniger gut bindende Proteine entfernt. Die Effizienz der Waschschrte kann durch die Zugabe von wenig Imidazol (20 mM) zum Waschpuffer erhöht werden. Eluiert wird das

Protein schließlich mit einem Phosphat-Puffer, der 150 – 300 mM Imidazol enthält und den 6xHis-Tag aus der Bindung verdrängt.

Da der Mechanismus nur von der Primärstruktur des Proteins abhängig ist, funktioniert er auch unter Bedingungen, unter denen das Protein denaturiert. Allerdings ist er pH-abhängig: Da Histidin bei niedrigen pH-Werten (< 4) protoniert vorliegt, kann es nur bei höheren pH-Werten an den Metall-Ionen binden.

Bis zu 5 ml Proteinrohextrakt wurden mit 1 ml in Bindepuffer voräquilibriertem Ni-NTA-Superflow (Bindekapazität bis 50 mg/ml) gemischt und in eine Plastiksäule gegeben. Die Mischung wurde unter Schütteln eine Stunde auf Eis inkubiert. Nachdem der Durchfluss (D) aus der Säule getropft war, wurde das Säulenmaterial dreimal mit je 2 ml Waschpuffer gewaschen (Waschfraktionen W1, W2, W3). Anschließend konnte das Enzym mit zweimal 1 ml und einmal 2 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert werden (Elutionsfraktionen E1, E2, E3). Der Durchfluss sowie alle Wasch- und Elutionsfraktionen wurden separat gesammelt und auf Enzymaktivität getestet.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Bindepuffer:

50 mM	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ -Puffer pH 8,0
300 mM	NaCl
10 mM	Imidazol

Waschpuffer

50 mM	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ -Puffer pH 8,0
300 mM	NaCl
20 mM	Imidazol (Enzyme: RAS, PAL)
	bzw.
15 mM	Imidazol (Enzym: 4CL)

Elutionspuffer

50 mM	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ -Puffer pH 8,0
300 mM	NaCl
250 mM	Imidazol

2.5.7 SDS-PAGE

Die sogenannte SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wurde erstmals 1970 von Laemmli beschrieben. Sie ermöglicht die Auftrennung von Proteingemischen nach Größe der erhaltenen Komponenten.

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Tensid, das an Proteinen bindet und deren Eigenladung überdeckt (1 g Protein binden 1,4 g SDS), so dass die Proteine schließlich eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Zur Auftrennung werden die Proben auf ein Gel auf Polyacrylamid-Basis geladen, an welches eine elektrische Spannung ange-

legt wird. Das Gel fungiert wie ein Sieb, das kleinere Moleküle einfacher hindurchwandern lässt als große. Nach erfolgter Auftrennung können die Proteine durch Färbungen z.B. mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht werden. Ein Größenmarker erlaubt die Abschätzung der Masse der Proteine in den Proben.

Das diskontinuierliche Polyacrylamid-Gel bestand aus zwei Teilen: Sammelgel und Trenngel, die nacheinander zwischen zwei Glasplatten gegossen wurden. Durch Zugabe von APS wird die radikalische Polymerisation gestartet, die die Gele fest werden lässt.

Das Trenngel bestand aus

1,25 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
1,45 ml	Aqua dest.
2,05 ml	Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid und 0,8 % Bisacrylamid, Roth)
200 µl	10 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
8 µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
35 µl	10 % Ammoniumperoxydisulfat (APS)

Bis zur vollständigen Auspolymerisation wurde das Trenngel mit n-Butanol überschichtet. Auf diese Weise wird zum einen eine sauerstofffreie Oberfläche erhalten, zum anderen die Oberfläche des Trenngels geglättet. Vor Zugabe des Sammelgels wurde das n-Butanol abgegossen und eventuelle Reste mit einem Filterpapier abgesaugt.

Zusammensetzung des Sammelgels:

625 µl	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
1,4 ml	Aqua dest.
375 µl	Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid und 0,8 % Bisacrylamid, Roth)
100 µl	10 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
5 µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
20 µl	10 % Ammoniumperoxydisulfat (APS)

Bevor die Proben auf das Gel geladen werden konnten, mussten sie mit Roti®-Load 1 Proteinauftragspuffer im Verhältnis 1 : 4 gemischt werden. Der Puffer dient dem Reduzieren und Denaturieren der Proteine. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten im Wasserbad auf 95° C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Im Probenpuffer erhaltene reduzierende Thiole spalten Disulfidbrücken. Danach wurden die Proben sofort auf Eis abgekühlt, schließlich kurz zentrifugiert und in die Taschen des Sammelgels geladen.

Als Größenmarker stand Roti®-Mark plus Standard zur Verfügung (Abb. 23).

Die Elektrophorese erfolgte über 2,5 Stunden bei 250 V und 140 mA. Als Elektrolyt diente ein SDS-haltiges Tris-Glycin-Puffersystem:

25 mM	Tris/HCl pH 8,3
192 mM	L-Glycin
0,1 %	SDS

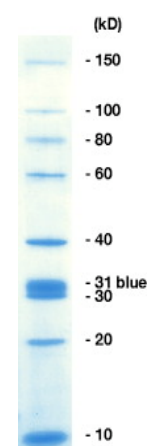


Abb. 23:
Roti®-Mark
plus Stan-
dard

Um die Proteine sichtbar zu machen, wurden die Gele anschließend in einer Färbelösung geschwenkt:

825 mg Coomassie Brilliant Blue R-250
150 ml Methanol p.a.
150 ml Aqua dest.
30 ml Eisessig

Da der Farbstoff von Proteinen besser gebunden wird als vom Gel, bleiben die Proteine nach Entfärben des Hintergrundes deutlich als Banden erkennbar.

Die Entfärbelösung bestand aus:

150 ml Methanol p.a.
150 ml Aqua dest.
30 ml Eisessig

Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die Gele mit Hilfe eines Flachbrett-Scanners eingescannt.

2.5.8 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Die Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) wurde bereits 1967 von Bennet beschrieben. Durch die stark hygroskopischen Eigenschaften der TCA werden, ähnlich wie bei der Ammoniumsulfat-Fällung, die Hydrathüllen der Proteine gelöst, so dass diese ausfallen. Da die TCA-Fällung irreversibel ist und sowohl einfach als auch schnell durchgeführt werden kann, dient sie vor allem zum Aufkonzentrieren von Proteinen vor der Gelelektrophorese (v.a. SDS-PAGE).

Verwendung fand sie zur Anreicherung des rekombinanten Proteins Hydroxymethyltransferase:CoA-Ligase (4CL), welches mit dem Vektor pRSET C exprimiert wurde.

800 µl des durch Affinitätschromatographie an einer Nickel-NTA-Säule aufgereinigten Proteins (erste Elutionsfraktion; Kap. 2.5.6) wurden mit dem äquivalenten Volumen 40 % TCA-Lösung gemischt und etwa 60 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (20 min, 16.000 g, 4 °C). Auf diesem Weg wurde ein Pellet erhalten, das zweimal mit je 500 µl eiskaltem Aceton p.a. (80 %) gewaschen wurde, um eventuelle Rückstände der TCA-Lösung zu entfernen. Nachdem es unter Vakuum getrocknet worden war, konnte das angereicherte Protein in 20 µl 0,1 M Natriumcarbonat-Lösung mit 10 % Saccharose resuspendiert werden.

2.5.9 Aufklärung der genomischen Sequenzen von 4CL und PAL

Die genomische Sequenz eines Enzyms ist nicht zwangsläufig mit dessen mRNA-Sequenz identisch, da die genomische Sequenz ein oder mehrere Introns enthalten kann, welche vor der Translation der mRNA aus der sogenannte prä-mRNA herausgespleißt werden müssen. Weil nur eukaryotische Zellen in der Lage sind, Introns heraus zu spleißen, wird zur heterologen Gewinnung eines Enzyms in der Regel auf dessen mRNA-Sequenz

zurückgegriffen. Die heterologe Expression einer Intron-haltigen Sequenz ist zwar ebenfalls möglich, kann aber nur in Hefen und nicht in Prokaryoten wie *Escherichia coli* erfolgen.

Da zum Southern Blotting genomische DNA (gDNA) verwendet wird, ist für eine optimale Interpretation der Ergebnisse die genomische Sequenz der Gene relevant.

Als Template enthielt die zur Aufklärung der genomischen Sequenzen angesetzte PCR gDNA, die nach der im Kapitel „Southern Blotting“ beschriebenen Methode (Kap. 2.6.1) isoliert worden war.

Die PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

	PAL	4CL
5x Puffer	5 µl	5 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl	2,5 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl	1 µl
sense-Primer (100 pmol/µl)	1 µl	1 µl
antisense-Primer (100 pmol/µl)	1 µl	1 µl
gDNA (aus unterschiedlichen Proben)	6,4 µg = 2 µl	12 µg = 6 µl
Aqua ster.	11 µl	8,5 µl
GoTaq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl	0,1 µl

Optimale Ergebnisse konnten bei Kombination der angegebenen Primerpaare durch folgende Annealing-Temperaturen (T_{An}) und Elongationszeiten (t_{EL}) erreicht werden:

	sense-Primer	antisense-Primer	T _{An}	t _{EL}
PAL	Mo-PAL-5'VL	Mo-PAL-3'VL	54,7 – 61,2 °C	3 min
4CL	4CLr- <i>Nco</i> I	4CLrc- <i>Xho</i> I	59,5 – 64 °C	1,5 min

Mit Hilfe der 4CL-Primer wurde ein Produkt von etwa 1300 Nukleotiden Länge amplifiziert, das PAL-Produkt umfasste etwa 3000 Basenpaare. Die aus den Agarose-Gelen extrahierten DNA-Sequenzen wurden in pGEM®-T kloniert und nach Aufreinigung des Plasmids mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit sequenziert.

2.6 Southern Blot-Analyse von 4CL, PAL und RAS

Die Zahl der im Genom auftretenden Isoformen von Enzymen kann mithilfe des Southern Blotting nachgewiesen werden. Von den an der Rosmarinsäure-Biosynthese von *Melissa officinalis* beteiligten Enzymen sollte die Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL), die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) und die Rosmarinsäure Synthase (RAS) auf Anzahl der Genkopien untersucht werden.

2.6.1 Isolierung genomischer DNA

Zunächst war es nötig, genomische DNA zu isolieren. Dies erfolgte nach einem Verfahren, welches sich eng an die 1985 von Rogers und Bendich beschriebene Methode anlehnte.

Zur Isolierung der DNA mussten ca. 200 mg in flüssigem Stickstoff gemörserte Zellen der *Melissa officinalis*-Suspensionskultur in 1,5 ml-Eppendorfgefäße eingewogen werden. Diese wurden nach Zugabe von 300 µl vorgewärmtem 2x CTAB-Puffer für 10 bis 30 Minuten unter mehrmaligem gründlichem Mischen bei 65 °C inkubiert, ehe sie 5 bis 30 Minuten auf Eis abkühlten.

Durch Mischen mit 300 µl Chloroform und anschließendes Zentrifugieren (5 min, 16.000 g) ließen sich störende Proteine und Polysaccharide von der DNA abtrennen. Das CTAB als chaotropes Salz sorgt in diesem Fall für eine Komplexbildung jener störenden Proteine und Polysaccharide; letztere sammeln sich beim Zentrifugieren in der Phasengrenze, die Proteine hingegen werden durch Chloroform extrahiert.

An diesen Reinigungsschritt schloss sich ein zweiter an: Der wässrige Überstand wurde zu 30 µl 10 x CTAB-Puffer, vorgewärmt auf 65 °C, pipettiert und nach Mischen mit 300 µl Chloroform erneut zentrifugiert.

Unterdessen konnten neue Eppendorfgefäße mit 250 µl CTAB-Präzipitationspuffer vorbereitet werden, in welche 250 µl des Überstandes gegeben wurden.

Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 16.000 g wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Das Pellet, welches die DNA enthält, bedeckte als dünner Film die Gefäßwand. Es wurde in 200 µl High Salt TE resuspendiert und mit 400 µl Ethanol p.a. gemischt, ehe die DNA durch 15-minütige Inkubation bei -20°C gefällt wurde.

Durch Zentrifugieren (15 min, 16.000 g) ließ sich die DNA als Sediment am Gefäßboden sammeln.

Der Überstand wurde abgenommen, das entstandene Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und von der Flüssigkeit befreit. Nach Lufttrocknung wurde die DNA in 30 µl TE-Puffer mit RNase A (2 mg/ml) aufgenommen und für etwa 20 Minuten bei 45 °C inkubiert.

Verwendete Puffer

2 x CTAB-Puffer:

CTAB	2 % (W/V)
Tris/HCl, pH 8	100 mM
EDTA pH 8,0	20 mM
NaCl	1,4 M
Polyvinylpyrrolidon	1 % (W/V)

10 x CTAB-Puffer:

CTAB	10 % (W/V)
NaCl	0,7 M

High Salt TE Puffer:

Tris/HCl, pH 8	10 mM
EDTA, pH 8	1 mM
NaCl	1 M

CTAB Präzipitations-Puffer:

CTAB	1% (W/V)
Tris/HCl, pH 8	50 mM
EDTA, pH 8	10 mM

2.6.2 Restriktionsverdau der genomischen DNA

Die so erhaltene genomische DNA wurde anschließend mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Ein Ansatz von 100 µl enthielt jeweils 35 µg DNA, 100 U Restriktionsenzym, 10 µl des passenden Puffers und steriles, demineralisiertes Wasser als Volumenausgleich.

Die Ansätze inkubierten über Nacht bei 37 °C.

Am folgenden Tag wurden, ca. 1 Stunden vor Beginn der DNA-Fällung, noch einmal jeweils 10 U Restriktionsenzym zu den Ansätzen pipettiert.

Vor der elektrophoretischen Auftrennung auf einem Agarosegel musste die DNA aus dem Ansatz ausgefällt werden. Hierzu wurden 10 µl 3 M Natriumacetat und 100 µl Isopropanol zum Ansatz pipettiert. Das Natriumacetat erhöht die Ionenstärke der Lösung, wohingegen das Isopropanol selbst für die Fällung der DNA verantwortlich ist. Nach 15-minütiger Fällung bei -20 °C konnte die DNA abzentrifugiert werden (20 min, 16.000 g). Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in 30 µl 1x TE-Puffer resuspendiert und für etwa 10 Minuten bei 56 °C inkubiert.

Die abgekühlte DNA-Lösung konnte nun durch Elektrophorese auf einem Agarose-Gel (0,7 % Agarose) langsam (110 V, 42 mA) aufgetrennt werden. Der erfolgreiche DNA-Verdau zeigt sich durch einen gleichmäßigen „Schmier“, welcher jedoch je nach eingesetztem Restriktionsenzym geringfügig unterschiedlich erscheint.

2.6.3 Southern Blotting

Durch Blotten mit einem Hochsalzpuffer (10x SSC) (die genaue Zusammensetzung aller verwendeter Lösungen findet sich am Ende des Kapitels 2.6.5) lässt sich die DNA aus dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen, wo sie fixiert werden kann.

Bevor der sogenannte Blot aufgebaut wird, muss das Gel vorbereitet werden. Damit auch Fragmente über 5 kb Länge effizient auf die Membran transferiert werden, wurde das Gel für 20 Minuten in 0,25 M Salzsäure geschwenkt. Hierbei kommt es zur Depurinierung der DNA: Sie zerbricht in kleinere Stücke. Anschließend erfolgte die Denaturierung der DNA: Durch Schwenken in 0,5 M NaOH mit 1,5 M NaCl für zweimal 20 Minuten trennt sich der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge auf. Abschließend wurde neutralisiert: Inkubation in Neutralisationslösung für ebenfalls zweimal 20 Minuten.

Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Der Aufbau des Blottes erfolgte auf folgende Weise:

In eine Wanne mit 10x SSC-Puffer wurde ein Kästchen gestellt, über welches eine Brücke aus Filterpapier hing, die auf beiden Seiten in den Puffer reichte. Darauf lag das Agarosegel (Taschen nach unten offen). Damit der Puffer nicht am Gel vorbei laufen konnte, wurde das Gel am Rand mit Plastikfolie isoliert. Auf dem Gel befanden sich, von unten nach oben, die Membran (positiv geladene Nylonmembran), vier Blätter Filterpapier, von denen zwei bereits in Puffer getränkt waren, und ein Stapel Papiertücher. Membran,

Filterpapier und Papiertücher waren auf Größe des Gels zugeschnitten. Beschwer wurde der Aufbau durch ein Gewicht (Abb. 24).

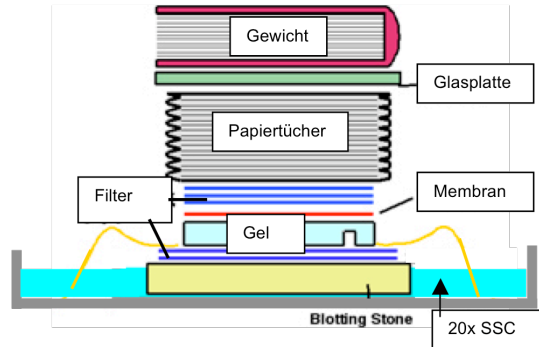


Abb. 24: Schematischer Aufbau des Southern Blots.

Das Blotten erfolgt in diesem Fall unter Ausnutzung der Kapillarkräfte: Der 10x SSC-Puffer wird durch Gel, Membran und Filterpapier gesaugt, die DNA wandert mit, bleibt aber auf der positiv geladenen Membran hängen.

Am folgenden Tag wurde die Konstruktion abgebaut, die Lage des Gels auf der Membran vorsichtig mit einem Bleistift markiert, das Gel verworfen und die DNA auf der Membran fixiert. Beim sogenannten *Cross-Linking* wird die Nylonmembran mit UV-Licht bestrahlt, wodurch die DNA kovalent an der Membran bindet. Anschließend müssen die DNA-freien Stellen der Membran blockiert werden. Dies geschieht durch Prähybridisierung: Hierzu wurde die Membran in einer dicht verschlossenen Schale mindestens eine Stunde bei 68 °C in Prähybridisierungslösung geschwenkt. Im Anschluß daran wurde über Nacht bei 68 °C hybridisiert. Die Hybridisierungslösung enthält zusätzlich zur Prähybridisierungslösung eine entsprechende DIG-markierte DNA-Sonde.

2.6.4 Herstellen einer DIG-markierten cDNA-Sonde

Die Herstellung der cDNA-Sonde für den Nachweis der entsprechenden Genkopien erfolgte mithilfe des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ der Firma Roche®, Mannheim.

Da im Kit ein Teil des UTP mit Digoxigenin (DIG) gekoppelt ist, enthält die fertige Sonde eine DIG-Markierung, die später für einen Antikörper-Nachweis verwendet werden kann. Der Antikörper selbst ist mit einem Reporter-Enzym gekoppelt, welches den Nachweis der Sonde ermöglicht. Als Reporter-Enzym dient alkalische Phosphatase.

Die zum Southern Blotting verwendeten Sonden bestanden aus Sequenzen, die aus dem konservierten Bereich der entsprechenden Enzyme ausgewählt worden waren.

Zur Herstellung der Sonden wurden folgende Primer und Annealingtemperaturen (T_{An}) verwendet:

4CL: Nv 5'- GC(AGT) CA(AG) CA(AG) GT(AGTC) CA(CT) GG -3'
 Nr 5'- CC(AGT) GT(AG) TG(AGTC) A(AG)C CA(ACT) CC -3'
 T_{An}: 50 °C
 Sonden-Länge: 625 Basenpaare

PAL: v 5'- GC(CT) AG(CT) AG(CT) GA(CT) TGG GTT ATG GA -3'
 h 5'- CT(CT) A(AG)(CT) TT(CT) TGC ATC A(AG)(AGTC) GGG TAG -3'
 T_{An}: 58,1 °C
 Sonden-Länge: 1508 Basenpaare

RAS: Fn7 5'- GCA AAC GCG CAC CAC TTA TCC GAC GGC GTC GCC GCC -3'
 Rn6 5'- CAC CGC CTT CCC CCA CCC (AG)AA (AG)TC CGG CTC (AG)TA -3'
 T_{An}: 75,6 °C
 Sonden-Länge: 700 Basenpaare

Ansatz: gemäß „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ der Firma Roche®, Mannheim

DNA	0,5 µl
PCR-Puffer + 15 mM MgCl ₂	5,0 µl
PCR DIG probe mix	5,0 µl
Primer forward	1,0 µl
Primer reverse	1,0 µl
Enzyme mix	0,75 µl
Aqua ster.	37,0 µl

PCR-Programm:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	94 °C	2 min
	T _{An}	1 min
	70 °C	2 min
32	94 °C	30 s
	T _{An}	1 min
	70 °C	2 min
1	94 °C	30 s
	T _{An}	2 min
	70 °C	10 min

Die Sonden wurden über ein Agarose-Gel aufgereinigt und aus dem Gel eluiert.

Vor der Herstellung der Hybridisierungslösung mussten die Sonden für ca. 5 Minuten in kochendem Wasser denaturiert und auf Eis abgekühlt werden; so konnten auch Sekundärstrukturen der Sonde gelöst werden.

100 ml Hybridisierungslösung enthielten etwa 20 µl der so erhaltenen Sonde.

2.6.5 Detektion der markierten DNA

Nach erfolgter Hybridisierung ist es notwendig, überschüssige Sonde von der Membran abzuwaschen, um die Spezifität des Nachweises zu erhöhen. Hierzu wurde das Wasserbad zunächst auf 58 °C (RAS, 4CL) beziehungsweise 60 °C abgekühlt, die Sondenlösung abgegossen und die Membran dreimal für 20 Minuten in Hybridisierung-Waschpuffer geschwenkt. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Äquilibration der Membran bei Raumtemperatur in Detektions-Waschpuffer. Darauf folgte das Blockieren freier Bindungsstellen durch einstündiges Schwenken der Membran in Blocking-Puffer, an welches sich eine 30-minütige Inkubation in Antikörper-Lösung anschloss. Nachdem die Membran viermal für jeweils 10 Minuten mit Detektions-Waschpuffer gewaschen worden war, wurde sie wenige Minuten in Detektionspuffer äquilibriert, ehe sie für zwei Minuten in CSPD-Lösung inkubiert wurde.

Der verwendete Antikörper ist mit dem Enzym alkalische Phosphatase verbunden, welches CSPD dephosphoryliert. Über eine instabile Zwischenstufe (metastable intermediate) zerfällt CSPD schließlich unter Lichtemission ($\lambda = 433 \text{ nm}$), welches durch entsprechende Filme detektiert werden kann (Abb. 25).

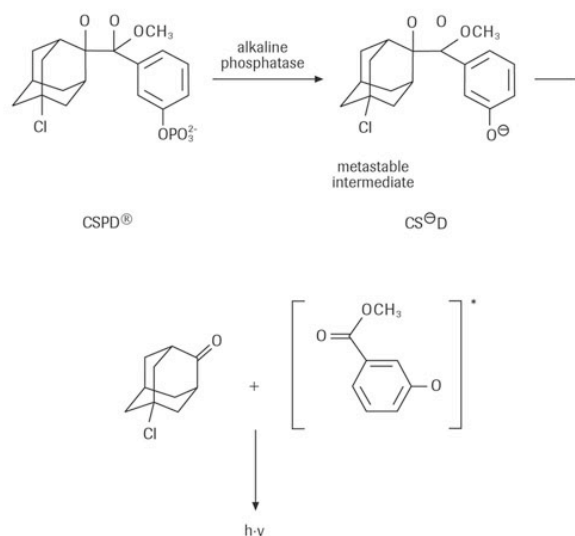


Abb. 25: Chemilumineszenz-Reaktion des CSPD

Der „Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film“ (Roche[®]) wurde bei 37 °C für einen ausreichenden Zeitraum (30 Minuten bis 5 Stunden) der Membran exponiert und anschließend in Entwickler „GBX developer and replenisher“ der Firma Kodak[®] entwickelt, der Film schließlich mit „GBX fixer and replenisher“ (Kodak[®]) fixiert. Die beschriebene Durchführung lehnte sich an folgende Methoden an: Southern (1975), Engler-Blum et al. (1993).

Zusammensetzung der zum Southern Blotting verwendeten Lösungen:

Neutralisationslösung:

0,1 M Tris/HCl pH 7,0
1,5 M NaCl

20x SSC

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat pH 7,0

Prähybridisierungs-Puffer

0,25 M Na₂HPO₄ pH 7,2
1 mM EDTA
20 % SDS
0,5 % Blocking-Reagenz

Hybridisierungs-Waschpuffer

20 mM Na₂HPO₄
1 mM EDTA
1 % SDS

Detektions-Waschpuffer

0,1 M Maleinsäure
3 M NaCl
0,3 % Tween 20
pH 8,0

Blocking-Lösung

Detektionswaschpuffer
1 % Blocking-Reagenz

Antikörper-Lösung

Detektionswaschpuffer
1 % Blocking-Reagenz
1:10.000 Antikörper

Detektionspuffer

0,1 M Tris/HCl
0,1 M NaCl
0,05 M MgCl₂
pH 9,5

CSPD-Lösung

Detektionspuffer
1:100 CSPD

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung einer Suspensionskultur

3.1.1 Vorbemerkung

Insgesamt fanden drei Charakterisierungen der zur Erstellung dieser Arbeit genutzten *Melissa officinalis*-Suspensionskultur statt. Zu Beginn sollte in einer ersten Charakterisierung beobachtet werden, welchen Einfluss unterschiedliche Saccharose-Gehalte auf die Rosmarinsäure-Akkumulation haben. Hierzu wurden Zellen in Medium mit 2 % Saccharose (CB2) und in Medium mit 4 % Saccharose (CB4) kultiviert. Im Laufe der zweiten Charakterisierung wurde geprüft, wie sich die Zugabe von 100 µmol/l Methyljasmonat auf die Rosmarinsäure-Biosynthese einer Kultur in CB2-Medium auswirkt. Die letzte Charakterisierung, die über 150 Kulturpassagen (= Wochen) später stattfand, diente der erneuten Beobachtung der Rosmarinsäure-Akkumulation im Kulturverlauf sowie der Durchführung von Expressionsstudien der Gene der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL), Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL) und Rosmarinsäure Synthase (RAS), deren cDNA-Sequenzen zwischenzeitlich aufgeklärt werden konnten.

Sämtliche Charakterisierungen verliefen über mindestens 10 Kulturtage. Die Wachstumsparameter (Frisch- und Trockengewicht), Mediumsparameter (pH-Wert, Leitfähigkeit und Brechungsindex als Maß für den Zuckergehalt des Mediums) und der Rosmarinsäure-Gehalt der Zellen wurden im Verlauf aller Charakterisierungen täglich erfasst. In der letzten Charakterisierung wurden zusätzlich die Enzymaktivitäten der an der Rosmarinsäure-Biosynthese beteiligten Enzyme, mit Ausnahme der Hydroxylasen, ermittelt und über semiquantitative PCR die Expression der PAL-, 4CL- und RAS-Gene überprüft.

3.1.2 Einfluss des Saccharose-Gehaltes des Mediums auf die Rosmarinsäure-Akkumulation

3.1.2.1 Wachstumsparameter

Aus Abbildung 26 ist ersichtlich, dass das Frischgewicht beider Kulturen zunächst bis zum 7. Kulturtag linear anstieg. An diesem Tag erreichten die in CB2-Medium kultivierten Zellen ein maximales Frischgewicht von etwa 18 g/Kolben. In CB4-Medium wurden sogar mehr als 20 g/Kolben gemessen. Anschließend sank das Frischgewicht der in CB2 kultivierten Zellen langsam wieder auf knapp 9 g/Kolben ab. Dieser Wert änderte sich in

den letzten Tagen kaum. Allerdings wurde beobachtet, dass sich die Kulturen in CB2-Medium ab dem achten Tag immer bräunlicher verfärbten.

In den Kulturen aus CB4-Medium konnten hingegen zwischen dem 7. und 13. Tag Werte um 21 g/Kolben gemessen werden bis am letzten Tag das Frischgewicht plötzlich abrupt unter 12 g/Kolben sank.

Die Konsistenz beider Kulturen wurde zum Ende hin deutlich breiig, sodass nach und nach auch die Abtrennung des Mediums durch Abnutschen kaum mehr zufriedenstellend möglich war, weshalb die wirklichen Frischgewichte unter den ermittelten Werten liegen dürften.

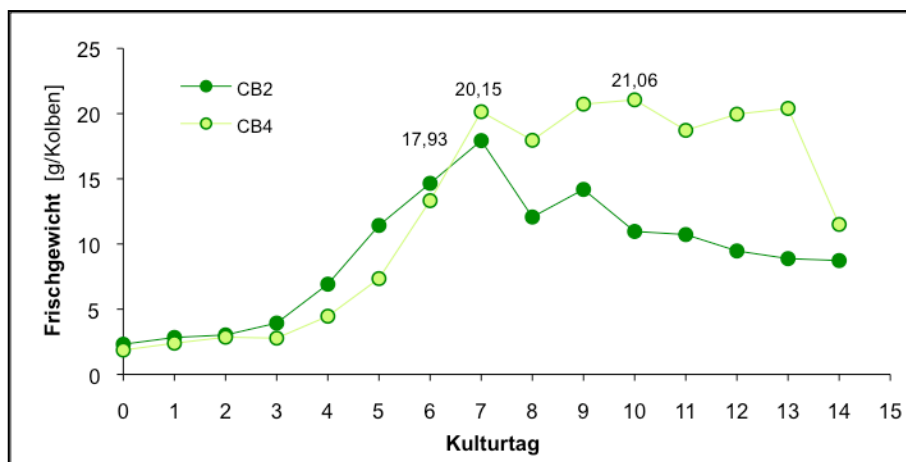


Abb. 26: Veränderungen des Frischgewichtes der Suspensionskulturzellen in CB2- und CB4-Medium im Verlauf der Charakterisierung

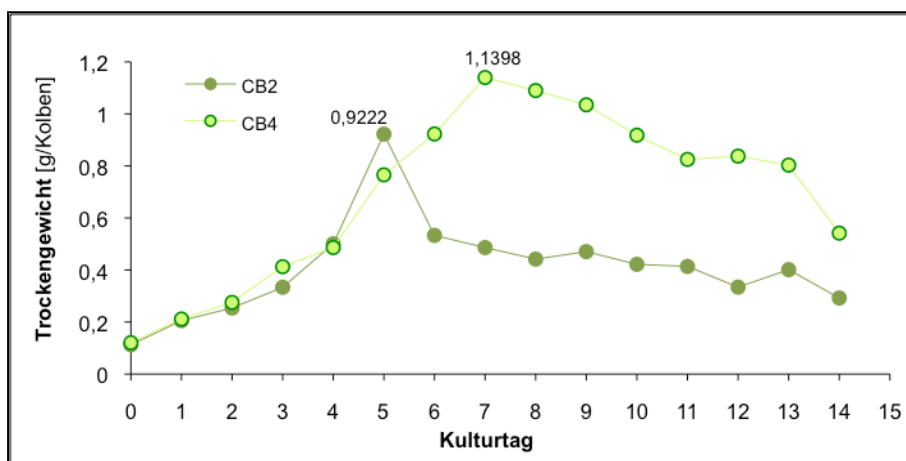


Abb. 27: Veränderungen des Trockengewichts der Suspensionszellen in CB2- und CB4-Medium im Verlauf der Charakterisierung

Das Trockengewicht stieg in beiden Medien zunächst gleichmäßig an, erreichte jedoch in Kulturen aus CB2-Medium bereits am 5. Tag ein Maximum von etwa 0,9 g/Kolben und sank anschließend erst schnell und schließlich in kleineren Schritten wieder ab. In CB4-Medium kultivierte Zellen nahmen sogar bis zum 7. Tag an Trockengewicht zu, ehe über

den restlichen Beobachtungszeitraum eine weitgehend kontinuierliche Abnahme des Gewichts beobachtet werden konnte (Abb. 27).

3.1.2.2 Mediumsparameter

Nachdem es in den ersten Tagen zu einem geringfügigen Absinken des pH-Wertes der Medien gekommen war, nahm dieser bis zum Ende der Charakterisierung stetig zu. Am 13. Tag wurde in beiden Medien ein maximaler Wert von pH 7,5 erreicht. Abgesehen von starken Schwankungen des pH-Wertes in CB4-Medium während der zweiten Hälfte der Charakterisierung, unterschieden sich die Verläufe der Messkurven beider Medien tendenziell kaum voneinander (Abb. 28).

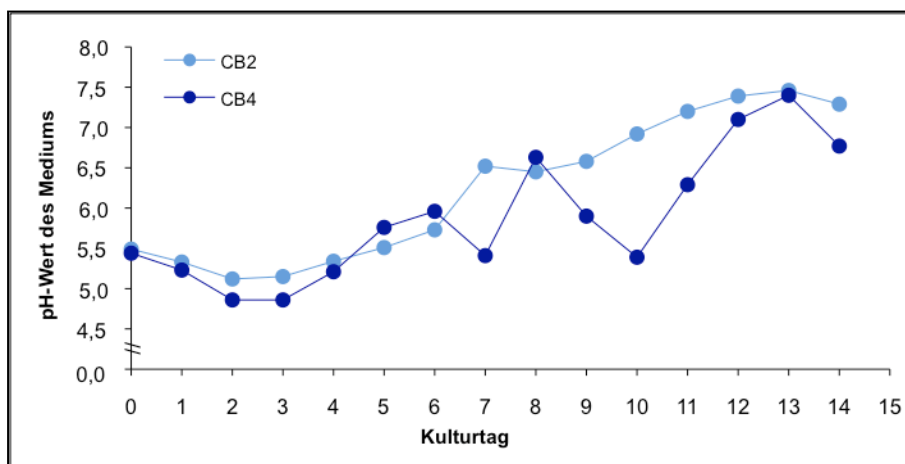


Abb. 28: pH-Wert des Mediums im Verlauf der Charakterisierung

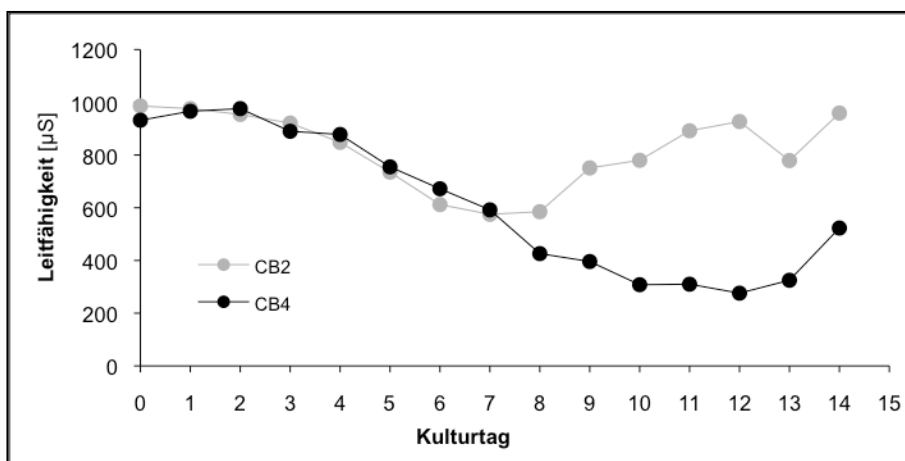


Abb. 29: Veränderungen der Leitfähigkeit in den Medien im Verlauf der Charakterisierung der Suspensionskultur

Die Leitfähigkeit des CB2-Mediums nahm bis zum 7. Tag der Kultivierung stetig ab, stieg danach jedoch innerhalb von 5 Tagen wieder auf die Höhe des Ausgangswertes an. In CB4-Medium konnte nach geringem Anstieg der Leitfähigkeit bis zum 2. Tag eine konti-

nuierliche Verringerung bis zum 12. Kulturtag beobachtet werden. Am 14. Tag nahm die Leitfähigkeit jedoch in beiden Medien noch einmal stark zu (Abb. 29). Die Zunahme der Leitfähigkeit ist ein Hinweis darauf, dass die Zellen absterben und Elektrolyte in das Medium entlassen.

In beiden Medien konnte zunächst eine schwache, ab dem 3. Tag eine stärkere Abnahme des Brechungsindex' als Maß für den Zuckergehalt des Mediums beobachtet werden, bis ein gleichbleibend niedriges Niveau erreicht wurde. Dies war in CB2-Medium ab dem 5. Kulturtag der Fall und in CB4-Medium ab dem 8. Kulturtag (Abb. 30).

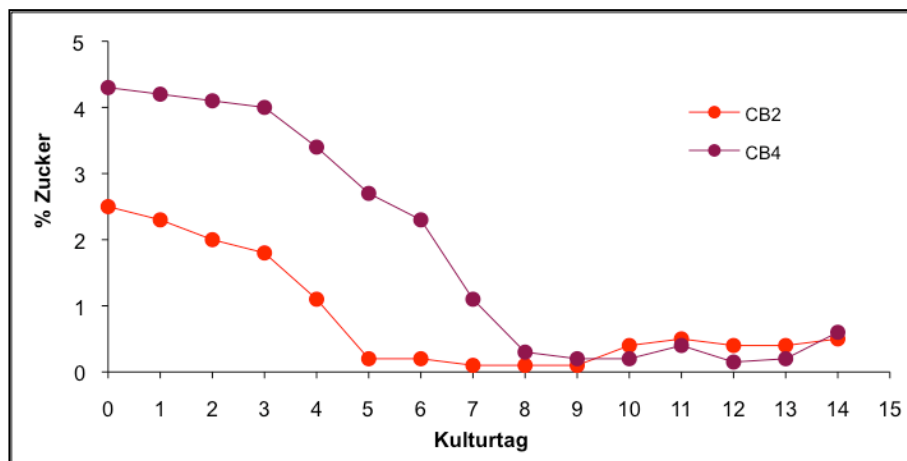


Abb. 30: Veränderung des Zuckergehaltes des Mediums im Kulturverlauf

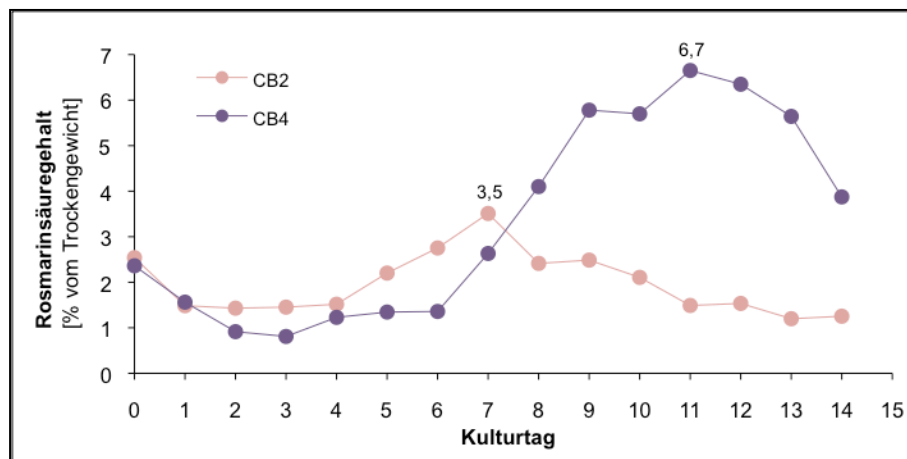


Abb. 31: Veränderung des Rosmarinsäure-Gehaltes der Zellen im Verlauf der Charakterisierung

3.1.2.3 Rosmarinsäure-Gehalt

In Hinblick auf die Menge der akkumulierten Rosmarinsäure unterschieden sich die beiden Kulturen deutlich voneinander. Obgleich es zunächst in beiden Medien bis zum 4. Tag zu einer Abnahme der Rosmarinsäure-Gehalte, bezogen auf das Trockengewicht der Zellen, kam, stiegen die prozentualen Rosmarinsäure-Gehalte anschließend in CB2-

Medium bis zum 7. Tag an, in CB4-Medium sogar bis zum 11. Tag (Abb. 31). Mit 6,7 % lag der höchste Wert, der von den in CB4-Medium kultivierten Zellen erreicht wurde, beinahe doppelt so hoch wie der Maximalwert, der in CB2-Medium gemessen wurde (3,5 %).

3.1.3 Elicitierung einer Suspensionskultur mit Methyljasmonat

Während der zweiten Charakterisierung wurde am dritten Tag ein Teil der in CB2-Medium kultivierten Zellen mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Methyljasmonat (MeJa) elicitiert. Vergleichskulturen wurden mit dem gleichen Volumen Ethanol p.a. versetzt, da Methyljasmonat in diesem Lösungsmittel gelöst worden war.

Jasmonat ist ein Elicitor, ein Botenstoff, der in Stresssituationen von der Pflanze produziert wird. Ausgelöst durch Elicitoren synthetisiert die Pflanze Sekundärmetabolite, die sie gegenüber Umweltstress wie Pathogenbefall und Fraßfeinde verteidigen soll. Viele dieser Sekundärstoffe stammen, wie Vorläufer der Rosmarinsäure, aus dem Phenylpropanstoffwechsel. In diversen Experimenten an Suspensionskulturen verschiedener Pflanzenarten konnte gezeigt werden, dass durch Elicitierung die Akkumulation der Rosmarinsäure gesteigert werden kann (u.a. Szabo et al., 1999).

3.1.3.1 Wachstumsparameter

Während der zweiten Charakterisierung stieg das Frischgewicht der Zellen zunächst bis zum 2. Kulturtag nur geringfügig an. Erst nach der Elicitierung am 3. Kulturtag nahm es zu und erreichte in den elicitierten Kulturen am 6. Tag ein Maximum von 7,25 g. In den Vergleichskulturen kam es nach Zugabe des Ethanols sogar bis zum 8. Tag zu einer Zunahme des Frischgewichtes. Nachdem an diesem Tag mit 15,25 g/Kolben der höchste Wert gemessen werden konnte, verringerte es sich in den folgenden Tagen wieder (Abb. 32).

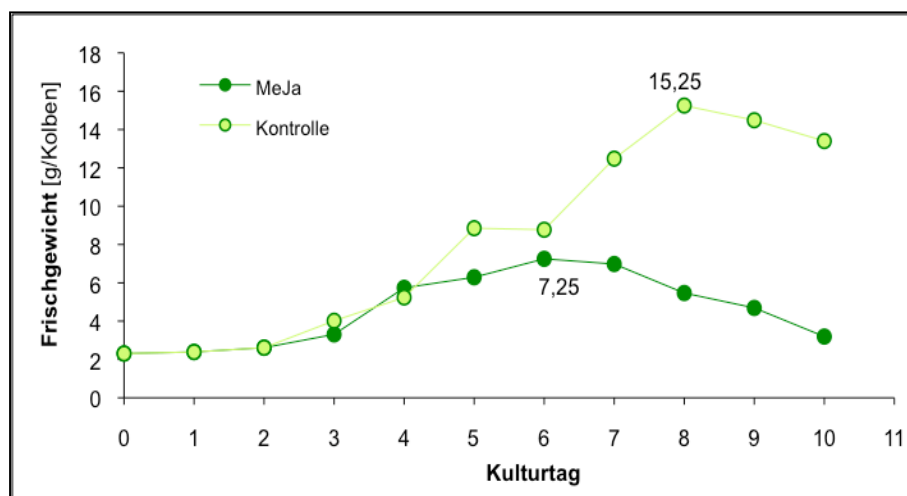


Abb. 32: Veränderungen des Frischgewichts im Kulturverlauf während der Charakterisierung einer elicitierten Kultur mit Kontrollkultur

Das Trockengewicht der mit Methyljasmonat elicierten Kultur stieg ab dem 3. Kulturtag an. Erst nach dem 8. Kulturtag nahmen die Werte langsam wieder ab. In der Kontrollkultur nahm das Trockengewicht der Zellen lediglich bis zum 7. Kulturtag stetig zu, um ab dem 8. Kulturtag ebenfalls langsam wieder abzufallen. Allerdings lagen die Gewichte, die in der elicierten Kultur gemessen wurden, deutlich unter jenen der Vergleichskultur (Abb. 33).

Solange die Trockengewichte zunehmen, beruht das Kulturwachstum hauptsächlich auf Zellteilungen. Wird bei konstantem oder abnehmendem Trockengewicht eine weitere Frischgewichtszunahme beobachtet, so deutet dies auf verstärkte Vakuolisierung der Zellen hin.

Auffällig war eine deutliche Braunfärbung der elicierten Kulturen ab dem 5. Kulturtag.

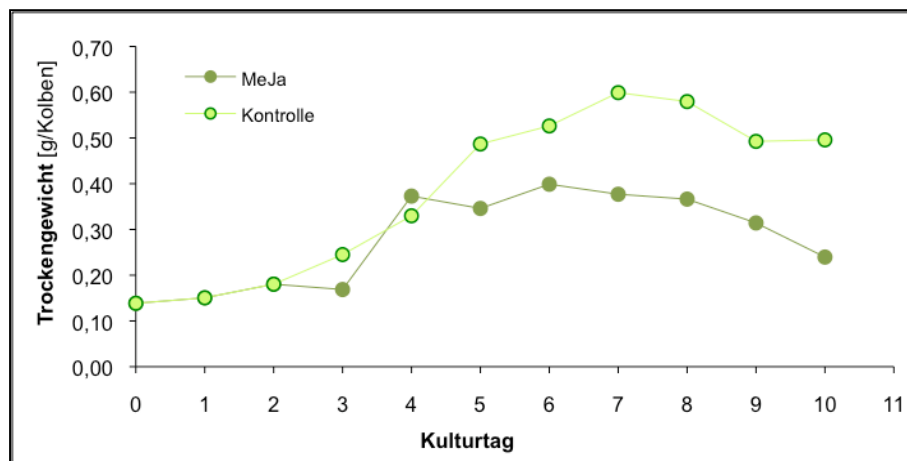


Abb. 33: Veränderungen des Trockengewichtes pro Kolben im Verlauf der Charakterisierung

3.1.3.2 Mediumsparameter

In den ersten Tagen blieb der pH-Wert des Mediums annähernd konstant. Erst nach Tag 3 stieg er an und erreichte ab dem 5. Kulturtag einen Wert, der mit leichten Schwankungen bis zum Ende der Charakterisierung erhalten blieb (Abb. 34).

Die Leitfähigkeit des Mediums sank zum ersten Tag ab, da die Suspensionskulturzellen unmittelbar nach dem Animpfen Wasser ins Medium abgeben und Phosphat entnehmen. Bis zum Zeitpunkt der Elicitierung stieg die Leitfähigkeit jedoch wieder auf den Ausgangswert an. Danach kam es in den mit Methyljasmonat behandelten Kulturen zu Schwankungen der Leitfähigkeit ohne deutliche Tendenz nach oben oder unten. Die Leitfähigkeit des Mediums der Vergleichskultur nahm zwischen dem 3. und 8. Tag kontinuierlich ab und blieb bis zum Ende der Beobachtung auf einem entsprechend niedrigen Niveau (Abb. 35).

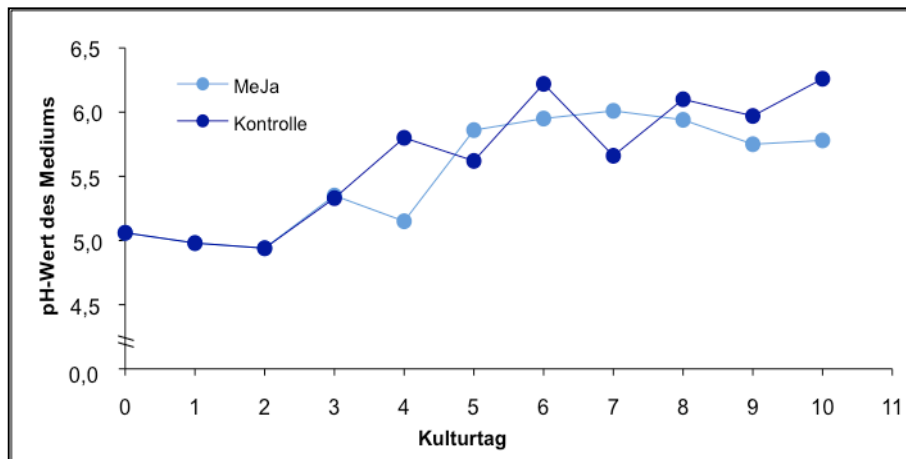


Abb. 34: pH-Wert des Mediums im Verlauf der Charakterisierung

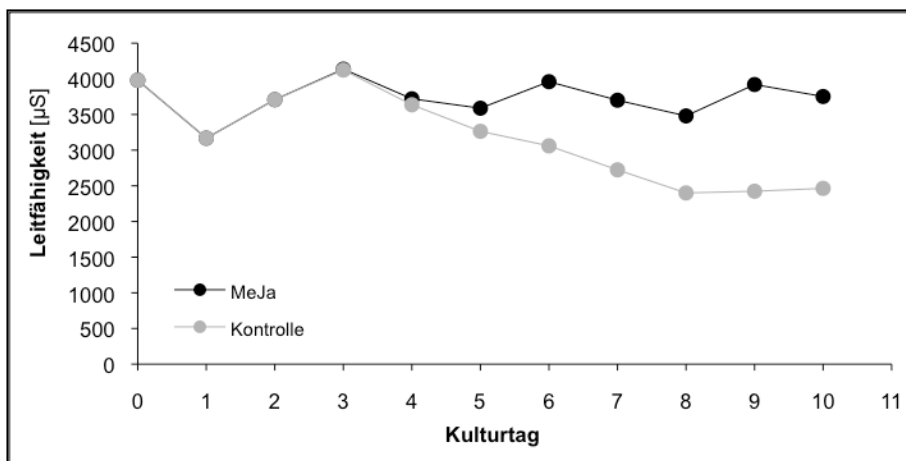


Abb. 35: Veränderungen der Leitfähigkeit des Mediums im Verlauf der Charakterisierung

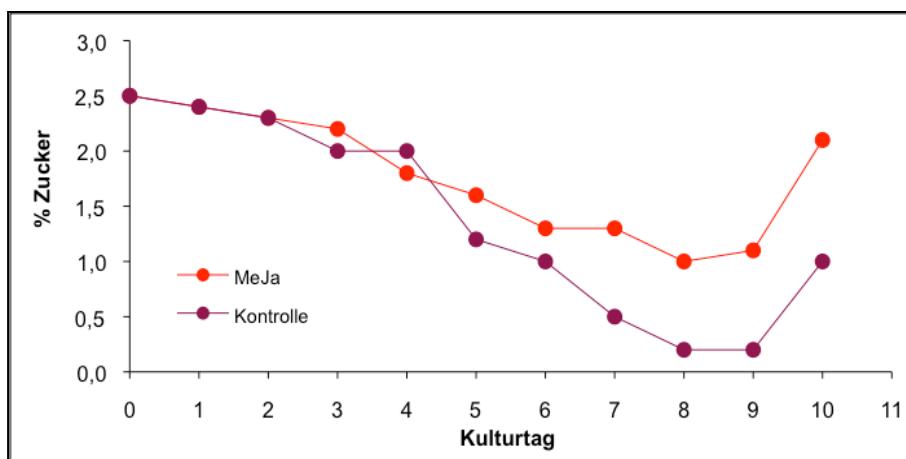


Abb. 36: Zuckergehalt des Mediums im Verlauf der Charakterisierung der Suspensionskultur

Der Zuckergehalt nahm in beiden Kulturen von Beginn der Charakterisierung bis zum 8. Tag ab, in der Vergleichskultur allerdings stärker als in der elicierten Kultur. Erst am 10. Tag konnte noch einmal ein Anstieg des Brechungsindex beobachtet werden (Abb. 36)

3.1.3.3 Rosmarinsäure-Gehalt

Während der ersten Tage der Beobachtung nahm die Rosmarinsäure-Menge zunächst nur langsam zu. Nach dem Zeitpunkt der Elicitierung konnte jedoch eine starke Akkumulation von Rosmarinsäure in den Zellen der elicierten Kulturen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu blieb der Rosmarinsäure-Gehalt der Vergleichskultur gering. Um den 6. Tag konnte in beiden Kulturen der Maximalwert gemessen werden. Dieser betrug in der elicierten Kultur 7,4 % und in der Vergleichskultur 3,3 % vom Trockengewicht. In der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraumes wurden abnehmende Werte beobachtet (Abb. 37).

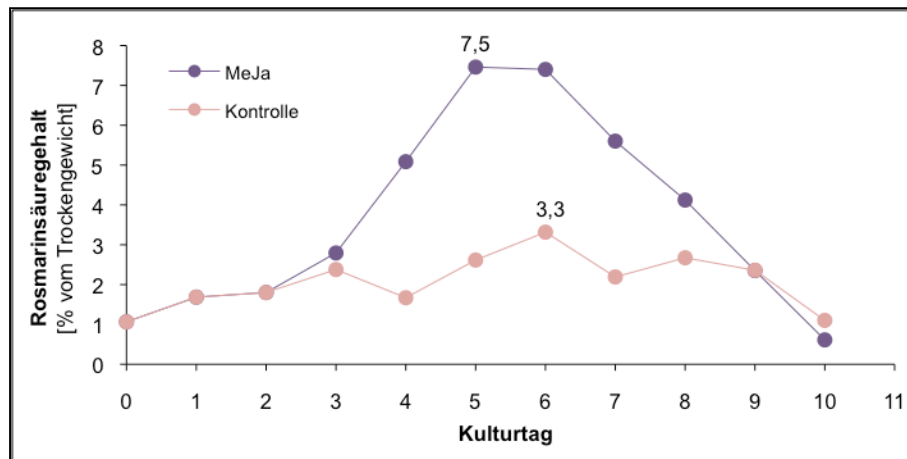


Abb. 37: Rosmarinsäure-Gehalt bezogen auf das Trockengewicht der Zellen im Kulturverlauf

3.1.4 Charakterisierung einer in CB2-Medium kultivierten *Melissa officinalis*-Suspensionskultur

3.1.4.1 Wachstumsparameter

Im Verlauf dieser Charakterisierung nahm das Frischgewicht von anfänglich 2,7 g/Kolben bis zum dritten Kulturtag zunächst langsam zu, bis nach einer deutlicheren Gewichtszunahme am siebten Kulturtag ein Maximum von 16,3 g/Kolben erreicht wurde. Bis zum elften Tag fiel das Frischgewicht geringfügig ab (Abb. 38).

Das Trockengewicht nahm kontinuierlich zu bis einem Maximum am fünften Kulturtag von 0,63 g/Kolben zu. Anschließend fiel es langsam wieder ab (Abb. 39).

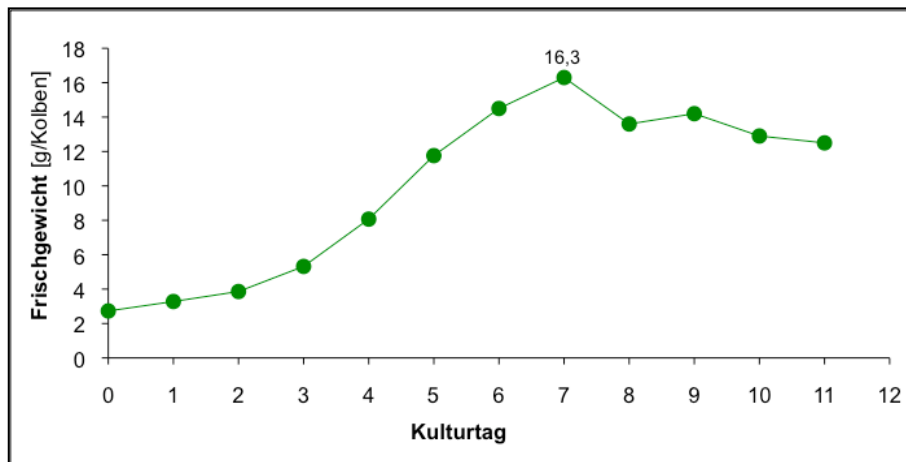


Abb. 38: Veränderung des Frischgewichtes der Suspensionskulturzellen im Verlauf der Charakterisierung

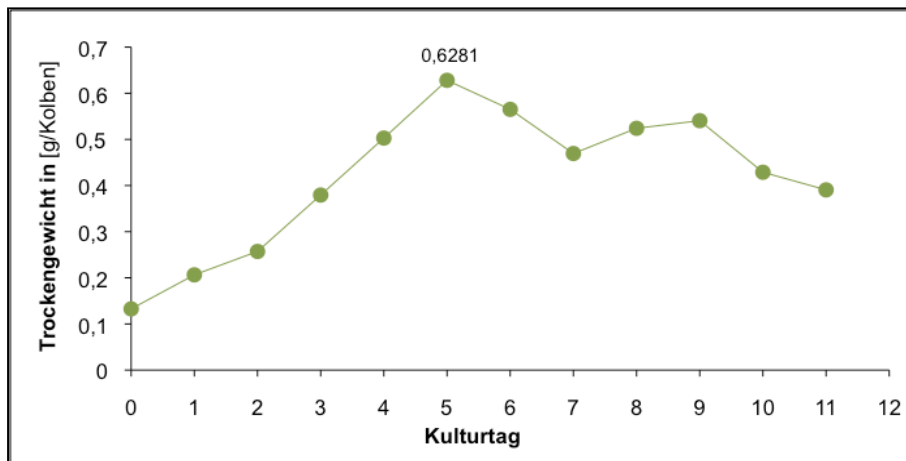


Abb. 39: Trockengewicht der Zellen pro Kolben im Verlauf der Kultivierung

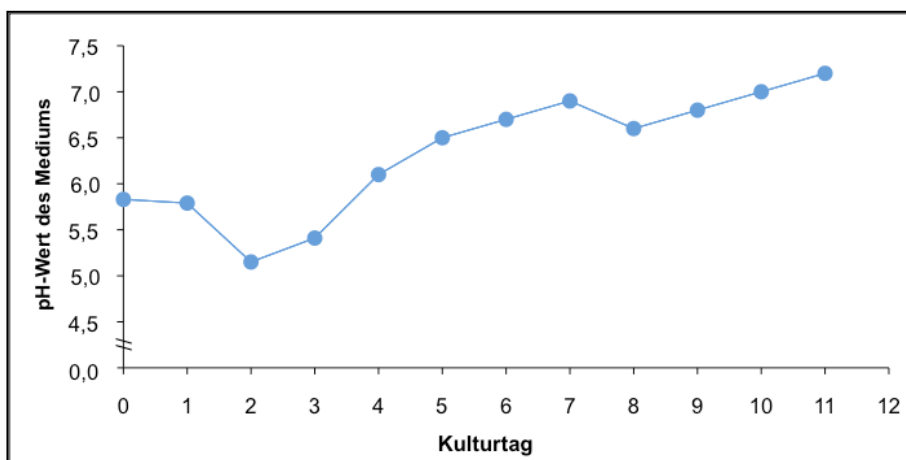


Abb. 40: pH-Wert des CB2-Mediums im Verlauf der Charakterisierung

3.1.4.2 Mediumsparameter

Der pH-Wert des Mediums fiel in den ersten beiden Tagen ab, stieg anschließend jedoch annähernd kontinuierlich an, bis am Ende der Charakterisierung ein Wert von 7,2 erreicht wurde (Abb. 40).

Während der Charakterisierung konnte ein Absinken der Leitfähigkeit des Mediums bis zum 7. Kulturtag beobachtet werden, ehe die Werte gegen Ende des Beobachtungszeitraumes langsam wieder anstiegen (Abb. 41).

Der Zuckergehalt des Mediums nahm bis zum 5. Tag kontinuierlich ab und blieb bis zum 11. Tag auf einem niedrigen Niveau (Abb. 42).

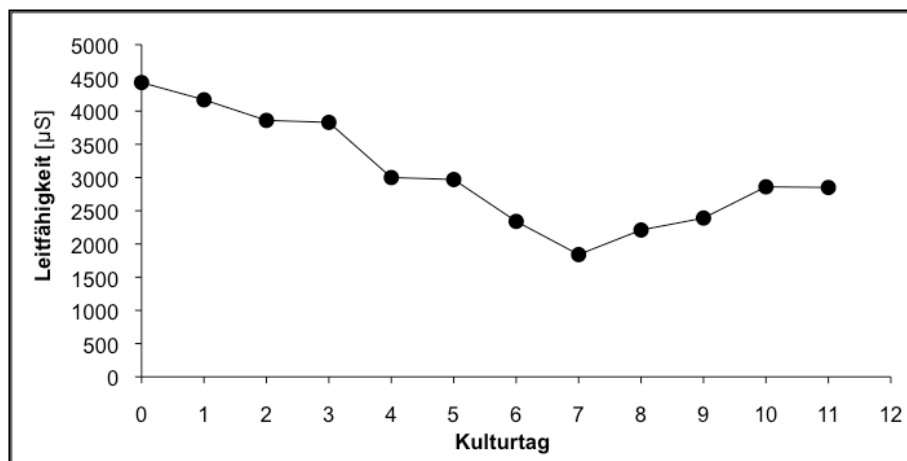


Abb. 41: Veränderung der Leitfähigkeit des Mediums im Verlauf der Charakterisierung der Suspensionskultur

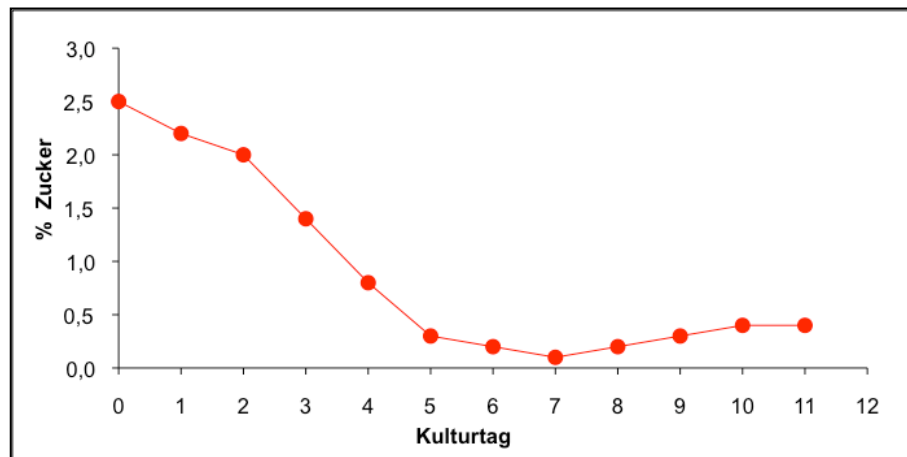


Abb. 42: Veränderung des Zuckergehaltes des Mediums im Kulturverlauf

3.1.4.3 Rosmarinsäure-Gehalt

In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass die Rosmarinsäure-Gehalte, die prozentual am Trockengewicht berechnet wurden, in den ersten Tagen der Charakterisierung kurzzeitig abnahmen, ehe zwischen dem 2. und 6. Kulturtag eine Akkumulation der Rosmarin-

säure beobachtet und an Tag 6 ein Wert von 6,1 % gemessen werden konnte. Bis zum 10. Kulturtag schwankten die Werte um 5,5 %, bevor am letzten Tag der Charakterisierung ein Maximalwert von 7,95 % erzielt wurde. Diese Werte sind erstaunlich hoch, da es sich einerseits um eine Kultivierung in CB2-Medium und zweitens um eine Kultur handelt, die bereits mehrere Jahre alt ist. In Einzelmessungen konnten diese hohen Werte jedoch bestätigt werden.

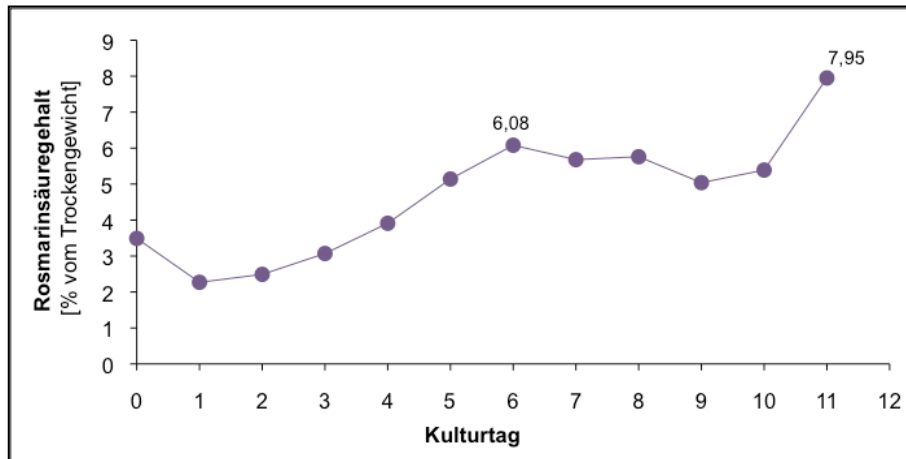


Abb. 43: Rosmarinsäure-Gehalt der Melissenzellen in Abhängigkeit vom Kulturtag berechnet in % vom Trockengewicht

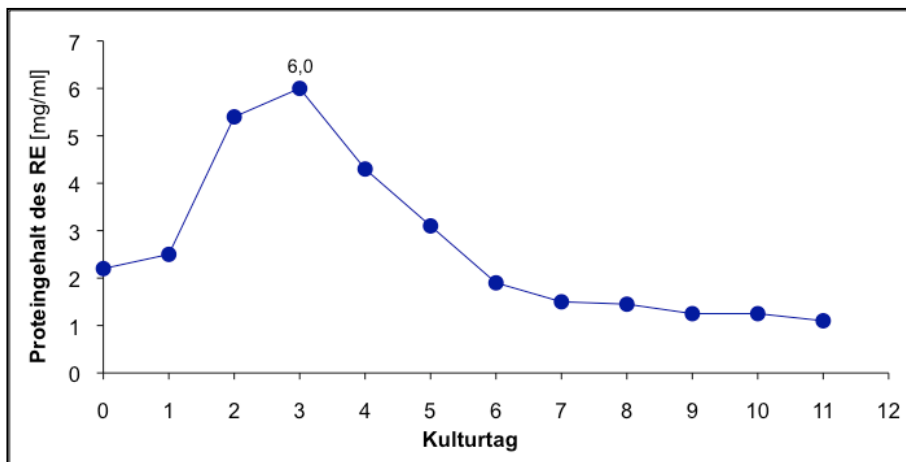


Abb. 44: Abhängigkeit des Proteingehalts des Proteinrohextraktes (RE) vom Erntetag der Zellen

3.1.4.4 Proteingehalt

Das Proteinrohextrakt (RE) wurde täglich auf exakt gleiche Weise aus den frisch geernteten Zellen nach der Anleitung des Kapitels 2.3.1 hergestellt und bis zur Messung des Proteingehalts nach der Methode von Bradford (Kap. 2.3.2) und der Durchführung sämtlicher Enzymtests (Kap. 2.3.3 bis 2.3.8) bei -20 °C gelagert.

Abbildung 44 gibt die gemessenen Proteinkonzentrationen des Proteinrohextraktes (RE) im Kulturverlauf wider. Ab dem ersten Tag der Charakterisierung kam es zu einem Anstieg des Proteingehaltes des RE. Nachdem bereits am 3. Tag ein Maximum erreicht worden war, fiel der Gesamtproteingehalt erneut ab. Vom 7. Tag an blieben die Werte bis zum Ende der Charakterisierung annähernd konstant.

3.1.4.5 Aktivität der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) und mRNA-Expressionsprofil

Die Aktivität der PAL wurde wie die Aktivitäten der übrigen im Verlauf dieser Charakterisierung getesteten Enzyme im Proteinrohextrakt bestimmt. Aufgrund der geringen gemessenen PAL-Aktivitäten (maximal 1,8 pkat am 3. Kulturtag respektive 23,4 μ kat/kg am 5. Kulturtag) erfolgte die Bestimmung mithilfe der HPLC (Kap. 2.3.3.1).

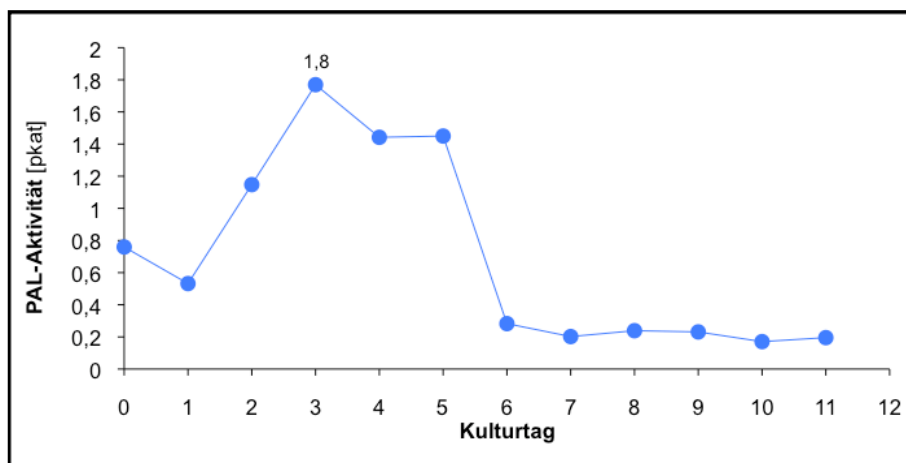


Abb. 45: Aktivität der PAL im Verlauf der Charakterisierung

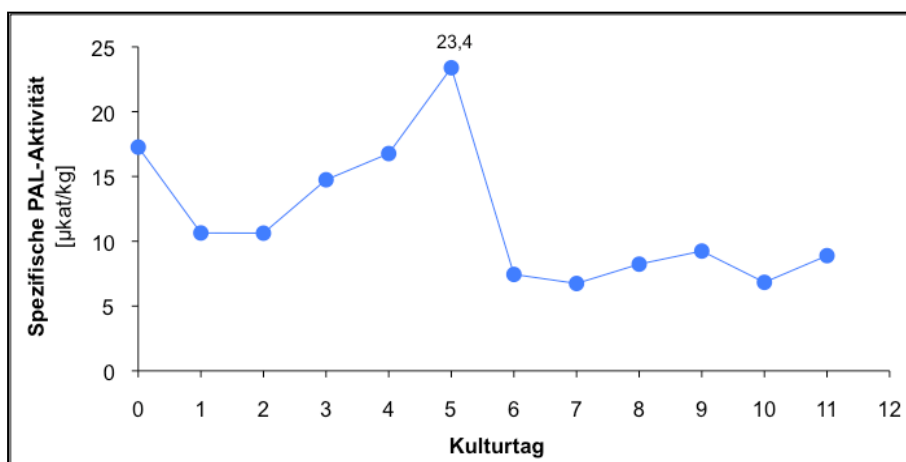


Abb. 46: Spezifische Aktivität der PAL im Verlauf der Charakterisierung einer *Melissa officinalis*-Suspensionskultur

Die beiden Abbildungen 45 und 46 zeigen die Aktivität sowie die spezifische Aktivität des Enzyms im Verlauf der Charakterisierung. Nach kurzzeitiger Verringerung der PAL-Aktivität unmittelbar nach Beginn der Charakterisierung konnte zwischen dem 1. und 3. Kulturtag ein Anstieg beobachtet werden. Bis zum 6. Tag sank die Aktivität des Enzyms wieder ab und verblieb bis zum Ende der Beobachtung auf einem entsprechend niedrigen Niveau (Abb. 45).

Die spezifische Aktivität, die den Anteil des betrachteten Enzyms am RE widerspiegelt, sank während der ersten Tage ab, ehe sie zum 5. Kulturtag anstieg. Vom 6. bis 11. Tag konnten gleichbleibend niedrige Werte registriert werden (Abb. 46).

Nachdem die PAL-cDNA-Vollängensequenz einer Isoform aufgeklärt worden war (Kap. 3.3.1), standen Vollängenprimer für das Enzym zur Verfügung. Diese wurden für eine semiquantitative PCR (Kap. 2.2.5) genutzt, um Aufschluss über die mRNA-Expressionslevel des Gens im Kulturverlauf zu erhalten.

Abbildung 47 zeigt das Agarosegel der semiquantitativen PCR. Das Expressionsprofil dieser PAL-Isoform verläuft parallel zur ermittelten spezifischen Aktivität der PAL (Abb. 46), die ab dem 2. Kulturtag anstieg und nach dem 5. Kulturtag abrupt abfiel. Nach dem 6. Kulturtag konnte beinahe keine PAL-cDNA mehr nachgewiesen und nur noch geringe Enzymaktivität gemessen werden.

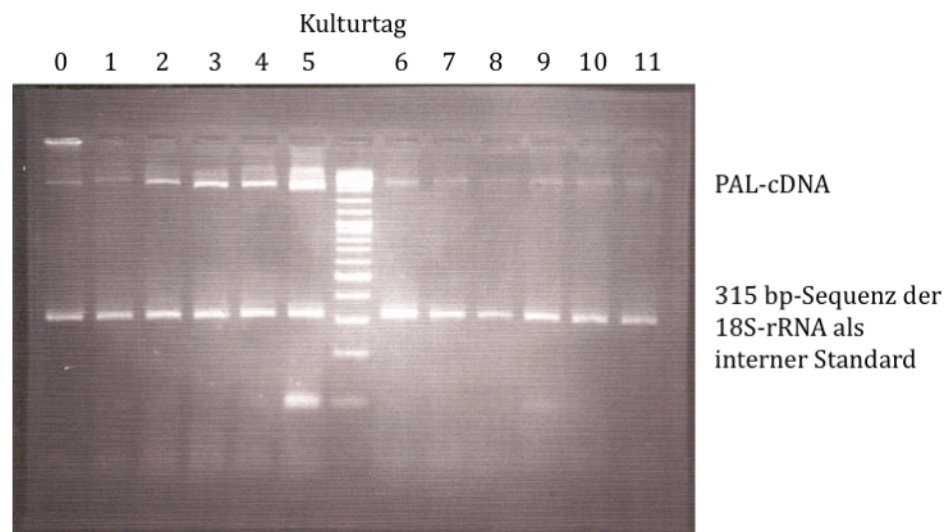


Abb. 47: Expressionsprofil der PAL-Vollängen-cDNA im Kulturverlauf

3.1.4.6 Aktivität der Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL) und mRNA-Expressionsprofil

Wie die PAL nahm auch die 4CL ab dem 1. Kulturtag beständig an Aktivität zu und erreichte ebenfalls am 3. Tag der Beobachtung ein Maximum, das bei 25,4 pkat lag. Anschließend fiel die Aktivität bis zum 6. Tag ab, stieg aber nach leichten Schwankungen bis zum Ende der Charakterisierung erneut auf einen mittleren Wert an (Abb. 48).

Die spezifische Aktivität dieses Enzyms schwankte bis zum 6. Tag um einen Wert von 80 μ kat/kg, ehe zum 8. Tag der Charakterisierung eine leichte Steigung beobachtet werden

konnte. Nachdem der Wert am 9. Tag abgesunken war, stieg er am 10. Tag noch einmal an, um am letzten Tag der Charakterisierung mit 263,5 $\mu\text{kat}/\text{kg}$ ein Maximum zu erreichen (Abb. 49).

Um eine sinnvolle Auswertung der 4CL-Aktivität zu gewährleisten wurde Kaffeesäure als Substrat im Enzymtest eingesetzt (vgl. Kap. 3.2.3).

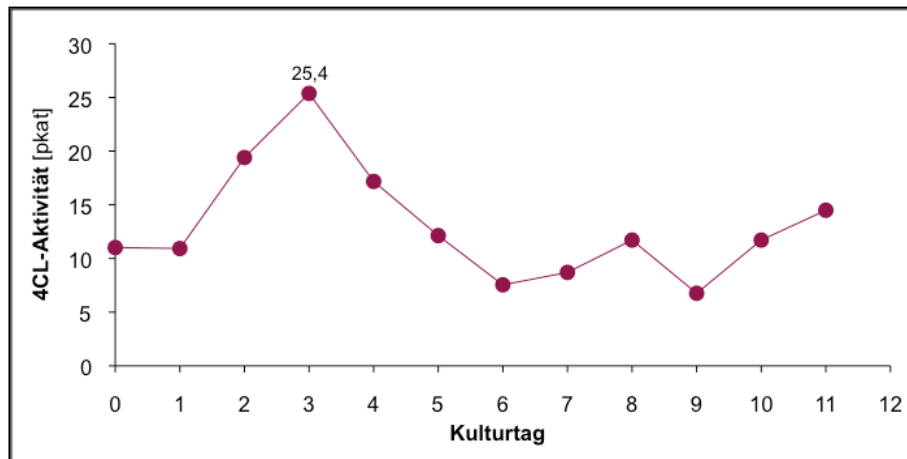


Abb. 48: Aktivität der 4CL im RE der Melissen-Zellen an den untersuchten Kulturtage

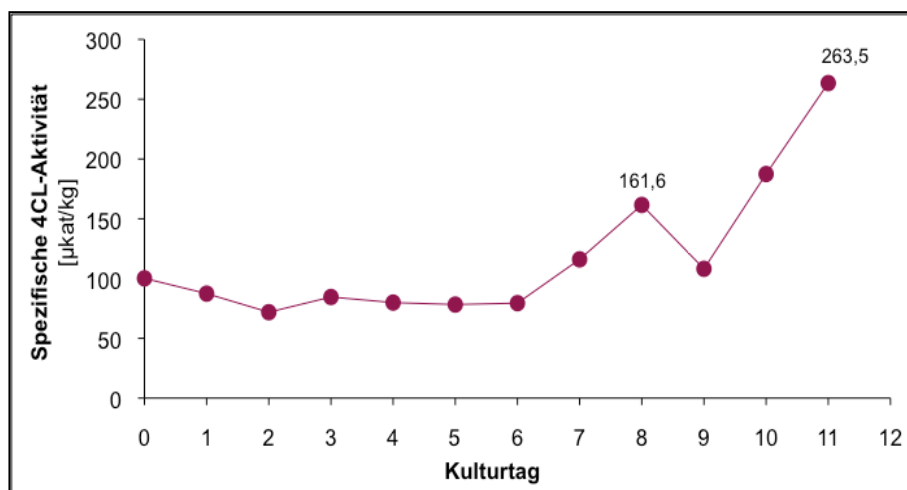


Abb. 49: Spezifische Aktivität der 4CL im Verlauf der Charakterisierung einer in CB2-Medium kultivierten *Melissa officinalis*-Suspensionskultur

Da die Erstellung des mRNA-Expressionsprofils der 4CL nicht in Form einer Duplex-PCR möglich war, wurden PCR-Ansätze mit 4CL-cDNA-Volllängenprimern respektive 18S-rRNA-Primern getrennt angesetzt, die Stücke anschließend durch ein gemeinsames Programm amplifiziert.

Abbildung 50 stellt das Ergebnis der semiquantitativen PCR dar. Auffällig hohe Expressionslevel der 4CL konnten am 3. und 5. Kulturtag beobachtet werden. Die auffällig hohe Transkription des Gens am 5. Kulturtag zeigt sich weder in einer

besonders hohen 4CL-Aktivität noch in einer erhöhten spezifischen Aktivität an diesem Tag. Da die 4CL in vielen Pflanzen in Form von Isoformen existiert, ist es möglich, dass auch die beobachtete 4CL-Aktivität der *Melissa officinalis*-Suspensionskultur im Verlauf der Charakterisierung durch verschiedene Isoformen beeinflusst ist und daher nicht mit dem Expressionsprofil der einen Isoform korreliert.

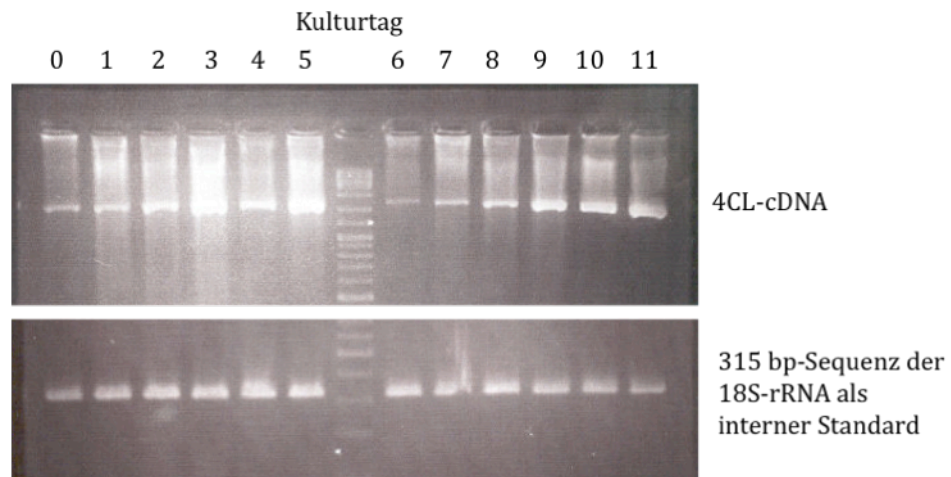


Abb. 50: mRNA-Expressionsprofil der 4CL im Verlauf der Charakterisierung einer *Melissa officinalis*-Suspensionskultur

3.1.4.7 Aktivität der Tyrosin Aminotransferase (TAT)

Die Tyrosin Aminotransferase (TAT) katalysiert die Umwandlung der Aminosäure L-Tyrosin zu 4-Hydroxyphenylpyruvat. In den ersten Tagen der Charakterisierung konnte eine Aktivitätszunahme der TAT beobachtet werden, die, bei insgesamt geringen Enzymaktivitäten, bereits am 3. Kulturtag in ein Maximum mündete (8,1 pkat). In den folgenden Tagen sank die Aktivität wieder ab und blieb zwischen dem 7. und 11. Tag auf einem konstant niedrigen Niveau unter 1 pkat (Abb. 51).

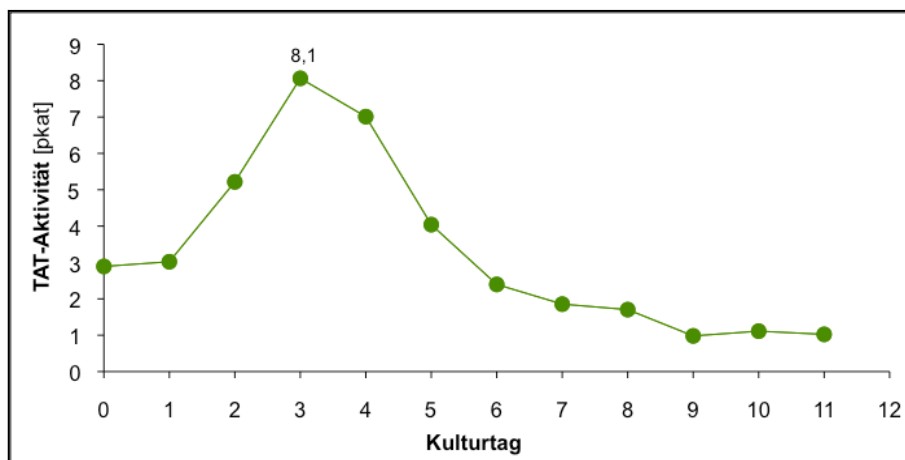


Abb. 51: Gemessene TAT-Aktivität im Verlauf einer Charakterisierung einer *Melissa officinalis*-Suspensionskultur

Die spezifische Aktivität des Enzyms verringerte sich in den ersten Tag und erreichte nach kurzem Anstieg erst am 4. Tag ein Maximum (32,6 $\mu\text{kat}/\text{kg}$). Anschließend sanken die ermittelten Werte, wie aus Abbildung 52 zu entnehmen ist, erneut langsam ab.

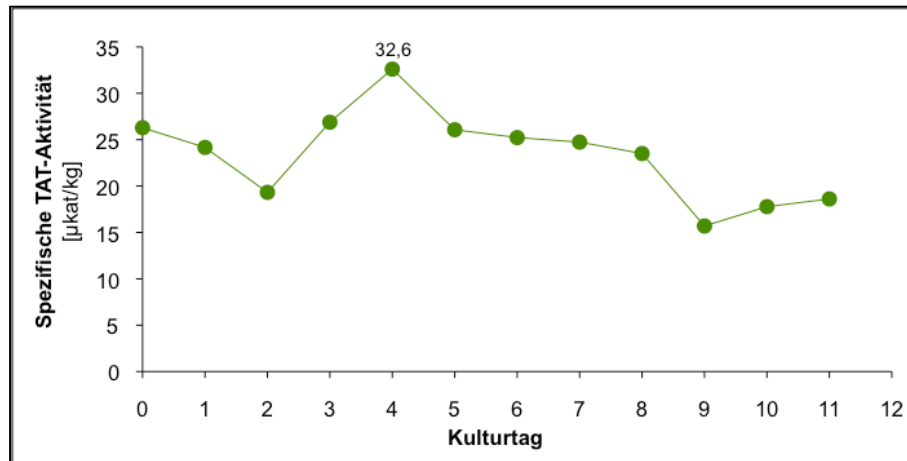


Abb. 52: Spezifische Aktivität der TAT in Abhängigkeit vom Kulturtag

3.1.4.8 Aktivität der Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR)

Ebenso wie es bereits bei PAL, 4CL und TAT beobachtet werden konnte, erreichte auch die Aktivität der HPPR am 3. Kulturtag ein Maximum. Das anfängliche Absinken der Aktivität, wie es am 1. Tag der Charakterisierung bei PAL und 4CL auftrat, blieb jedoch bei der HPPR aus. Bis zum 6. Tag sank die Aktivität im gleichen Maße, wie sie zunächst zugenommen hatte, wieder ab. Schon am 7. Kulturtag war keine HPPR-Aktivität mehr messbar (Abb. 53).

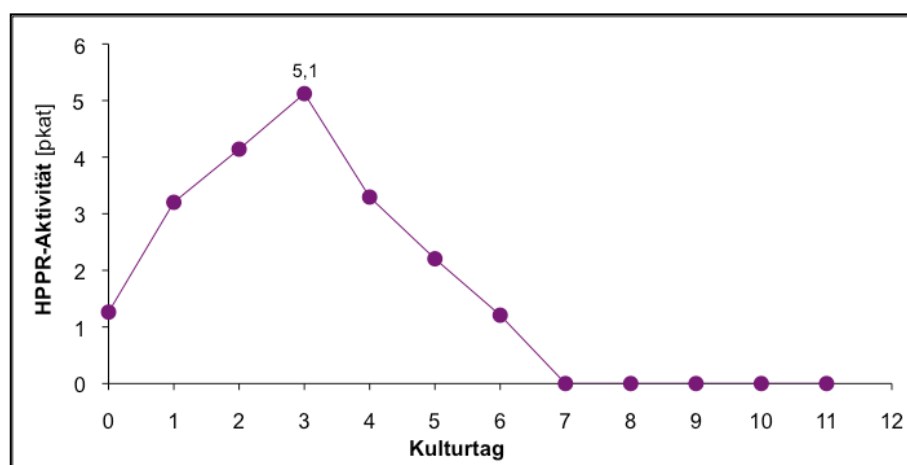


Abb. 53: Gemessene HPPR-Aktivitäten an den Kulturtagen im Verlauf der Charakterisierung

Die maximale spezifische Aktivität des Enzyms wurde mit 25,6 $\mu\text{kat/kg}$ bereits am 1. Kulturtag ermittelt. An allen übrigen Tagen mit HPPR-Aktivität waren die errechneten Werte annähernd gleich groß (Abb. 54).

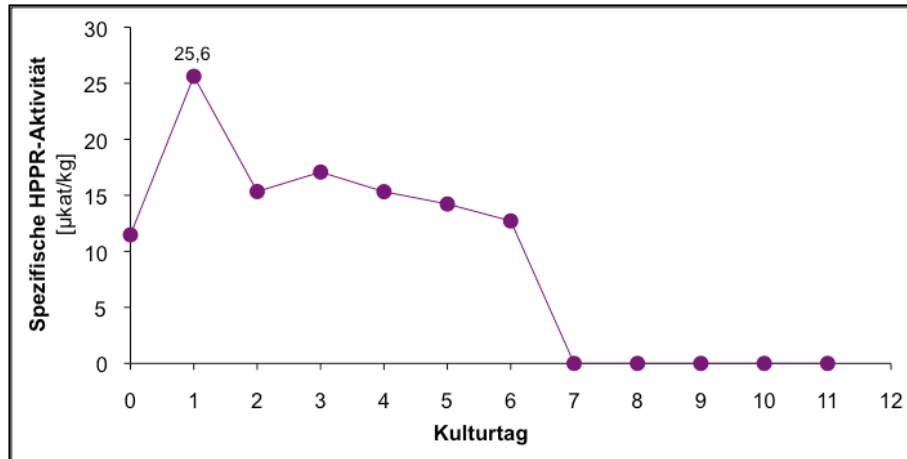


Abb. 54: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPPR im RE vom Erntetag

3.1.4.9 Aktivität der Rosmarinsäure Synthase (RAS) und mRNA-Expressionsprofil

Auch die höchste RAS-Aktivität konnte am 3. Kulturtag gemessen werden. Anders als bei den übrigen Enzymen nahm die Aktivität der RAS an den folgenden Tagen jedoch nicht unmittelbar wieder ab, sondern blieb bis zum 5. Tag auf einem hohen Niveau. Wie aus Abbildung 55 zu erkennen ist, verringerte sich die Aktivität erst danach kontinuierlich.

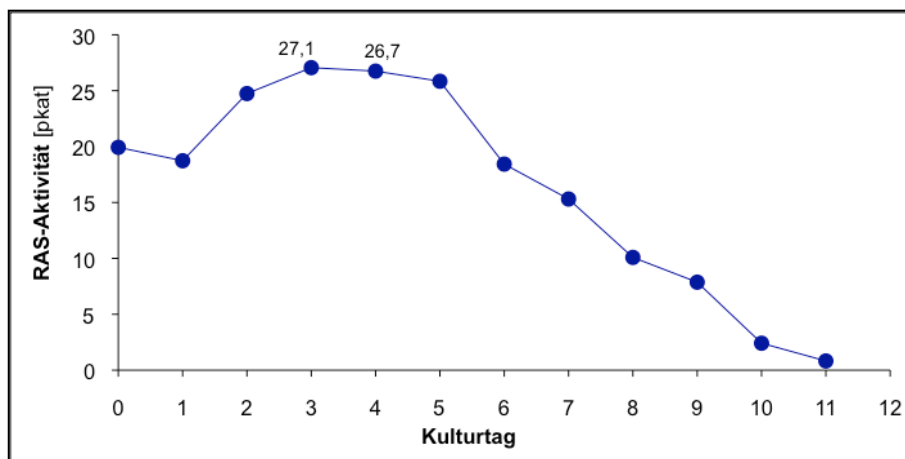


Abb. 55: Gemessene RAS-Aktivitäten im Verlauf der Charakterisierung einer Suspensionskultur von *Melissa officinalis* in CB2-Medium

In Abbildung 56 ist zu sehen, dass aus der Auftragung der spezifischen Enzymaktivität ein ganz anderer Kurvenverlauf resultiert: So kam es zunächst zu einem Absinken der

Werte, ehe ab dem 3. Tag eine Zunahme der spezifischen Aktivität verzeichnet werden konnte. Erst nach dem 8. Tag nahmen die Werte wieder ab.

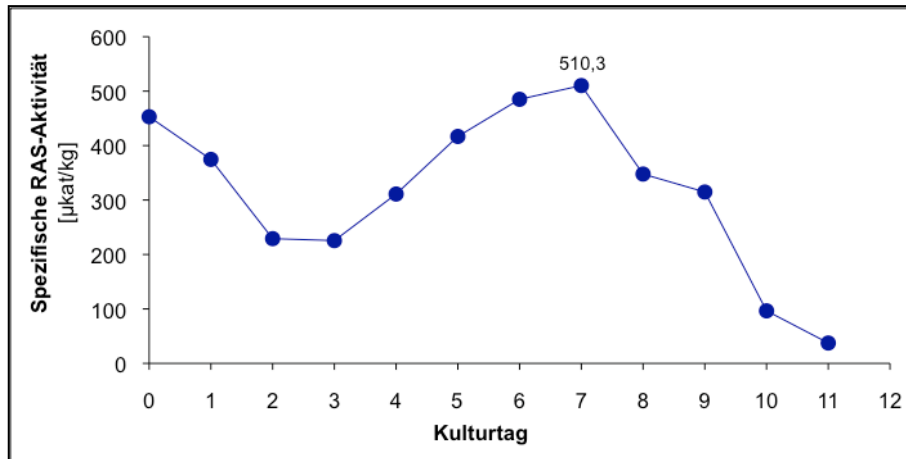


Abb. 56: Spezifische Aktivität der RAS im Kulturverlauf

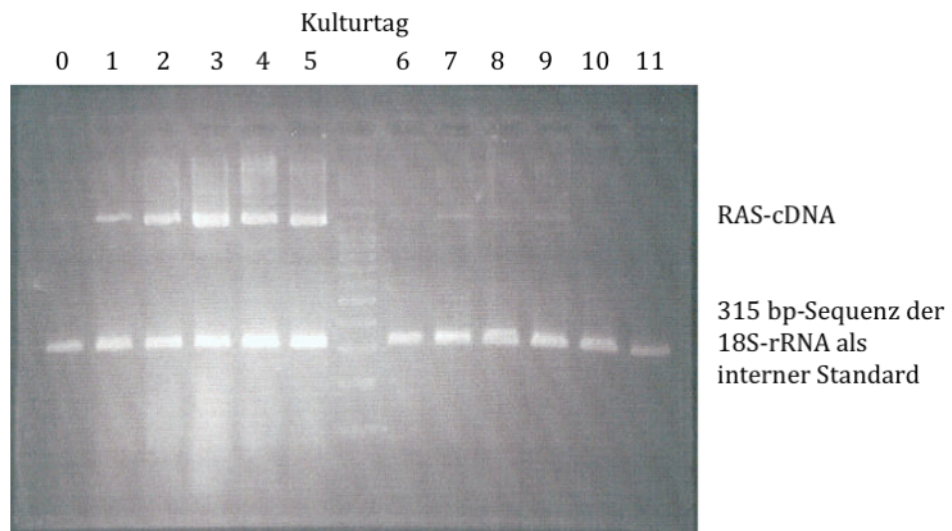


Abb. 57: mRNA-Expressionsprofil der RAS im Kulturverlauf

Das Agarosegel in Abbildung 57 gibt das mRNA-Expressionslevel der RAS im Verlauf der Charakterisierung wieder. Hohe Genexpression findet zwischen dem zweiten und fünften Kulturtag statt. Dies sind die Kulturtag mit der höchsten RAS-Aktivität (Abb 55). Eine deutlich schwächere Bande ist am 1. Kulturtag erkennbar. Ab dem 6. Kulturtag können beinahe keine Transkripte des Gens beobachtet werden.

3.2. Charakterisierung der an der Rosmarinsäurebiosynthese beteiligten Enzyme aus Melissen-Suspensionskulturen

3.2.1 Charakterisierung der Phenylalanin Ammoniak-Lyase

Die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) ist das erste Enzym des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels. Sie desaminiert L-Phenylalanin zu *t*-Zimtsäure. Die Aktivität der PAL kann im Proteinrohextrakt (RE) nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der PAL-Aktivität stehen zwei Methoden zur Verfügung: Die photometrische Messung des entstehenden Reaktionsproduktes, *t*-Zimtsäure, über die Absorptionszunahme bei 290 nm und die Auswertung durch HPLC. Photometrische Messungen von Enzymaktivitäten haben den Vorteil, schneller als HPLC-Auswertungen zu sein. Zudem kann die Linearität der ablaufenden Reaktion direkt während der Messung überprüft werden. Andererseits sind sie weniger empfindlich.

Da im RE nur geringe PAL-Enzymaktivität gemessen werden konnte, wurden sämtliche Enzymcharakteristika mithilfe des sensibleren HPLC-Tests ermittelt. Eine genaue Anleitung für die Durchführung dieses Tests findet sich in Kapitel 2.3.3.

3.2.1.1 Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration

Im Standardenzymtest konnte bei einer Inkubationstemperatur von 36 °C und einer Reaktionszeit von 10 Minuten bis zu einer Konzentration von mindestens 0,65 mg/ml Protein im Testansatz ansteigende PAL-Aktivität beobachtet werden. Ein linearer Reaktionsverlauf ist, wie aus Abbildung 58 ersichtlich, bis zu einer Konzentration von 0,4 mg/ml gegeben.

Zur Charakterisierung der PAL wurden Proteinkonzentrationen gewählt, die einen linearen Reaktionsverlauf gewährleisten.

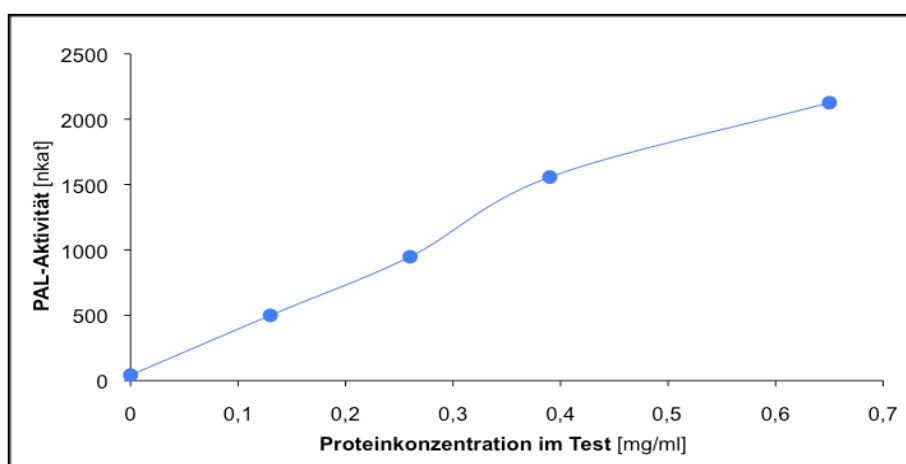


Abb. 58: Abhängigkeit der PAL-Aktivität von der eingesetzten Proteinkonzentration im Test

3.2.1.2 Temperaturoptimum

Um die optimale Reaktionstemperatur der PAL zu bestimmen, wurden die Testansätze in einem Temperaturbereich von 0 °C bis 80 °C inkubiert. Üblich war die Bestimmung von Doppelproben. Zum Temperieren des Ansatzes wurden die Proben bereits vor dem Start der Reaktion, welcher durch Zugabe des RE erfolgte, mehrere Minuten in den entsprechenden Wasserbädern inkubiert. Nachdem die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 6 N HCl abgestoppt worden war, wurden die Proben auf Eis abgekühlt und unmittelbar mit Ethylacetat ausgeschüttelt.

Das Temperaturoptimum der PAL liegt bei 50 °C (Abb. 59).

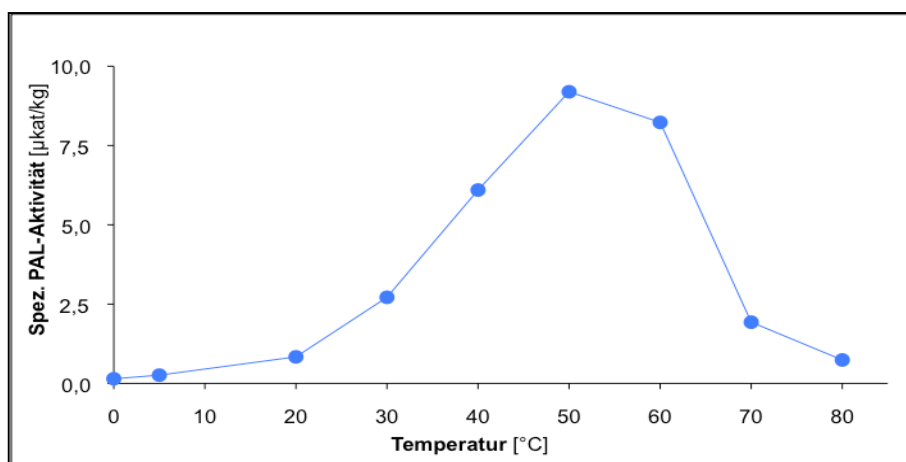


Abb. 59: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der PAL von der Inkubationstemperatur

3.2.1.3 pH- und Puffer-Optimum

Versuche, das pH-Optimum der PAL photometrisch zu bestimmen, resultierten gerade bei niedrigen pH-Werten in einer Trübung der Testansätze. Da die Trübung nicht nur in der Probe sondern auch in der Referenz beobachtet werden konnte, muss es sich um Bestandteile des RE handeln, die ausfallen und die Messung stören. Aus diesem Grund wurde auch zur Ermittlung des pH- und Puffer-Optimums der HPLC-Test gewählt.

Um den pH-Wert des Testansatzes während der Reaktion möglichst konstant zu halten, wurden $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer und Tris/HCl-Puffer mit einer Konzentration von 0,5 mol/l gewählt. Obwohl die optimale Reaktionstemperatur des Enzyms höher liegt, wurde bei 36 °C inkubiert.

pH- und Puffer-Optima konnten für folgende Puffersysteme ermittelt werden:

Puffer-System	getesteter pH-Bereich (pH im Reaktionsansatz)
Borsäure-Borax-Puffer	6,45 – 8,90
0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer	1,25 – 8,55
0,5 M Tris/HCl-Puffer	5,50 – 9,15

Die höchste spezifische Enzymaktivität von 35 $\mu\text{kat/kg}$ wurde in Borsäure-Borax-Puffer bei pH 7,85 ermittelt. In $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer liegt das pH-Optimum bei pH 8,20 und in Tris/HCl-Puffer bei pH 8,50.

Aus Abbildung 60 ist deutlich zu erkennen, dass die Enzymaktivität in Borsäure-Borax-Puffer höher ist als in $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer und Tris/HCl-Puffer.

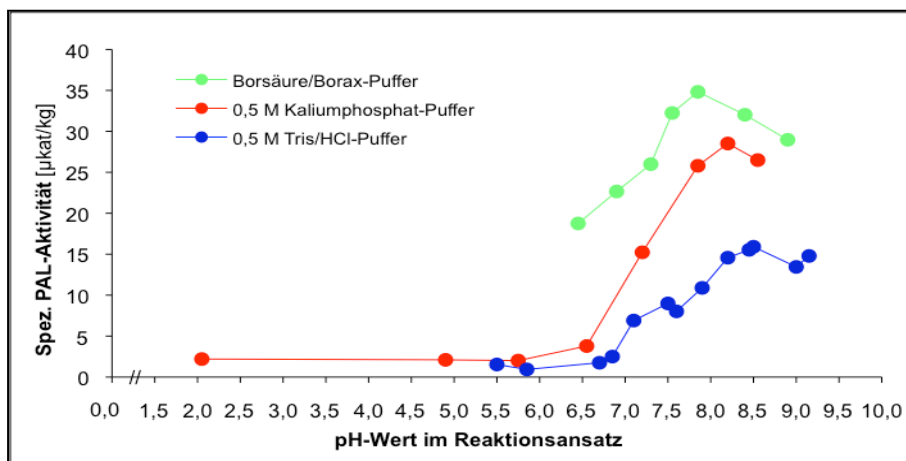


Abb. 60: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der PAL von Puffer und pH-Wert des Testansatzes

3.2.1.4 K_m -Wert für L-Phenylalanin

Eine Bestimmung des K_m -Wertes für L-Phenylalanin war weder photometrisch noch durch HPLC möglich, da die Enzymaktivitäten der PAL im RE zu gering waren. Weder durch Inkubation bei optimaler Reaktionstemperatur noch durch Variation der Enzymkonzentration oder durch Verdoppelung des Volumens des Testansatzes konnte ein K_m -Wert ermittelt werden. Sämtliche Tests wurden bei diversen Inkubationszeiten ohne sinnvoll auswertbare Ergebnisse durchgeführt.

3.2.2 Charakterisierung der Zimtsäure 4-Hydroxylase

Die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) gehört zur Superfamilie der Cytochrom P450-Enzyme. Ihre Aktivität kann in der Mikrosomen-Fraktion ermittelt werden. Die Mikrosomen-Fraktion wurde wie unter 2.3.4.1 beschrieben gewonnen und entsalzt.

3.2.2.1 Ermittlung der optimalen Reaktionszeit

In einem Standardenzymtest mit 0,5 mg Protein (Konzentration im Reaktionsansatz: 2 mg/ml) konnte über einen Zeitraum von bis zu 20 Minuten eine Zunahme der Produktbildung beobachtet werden (Abb. 61).

Die Reaktion wurde in allen Tests durch Zugabe von 0,5 mg Protein gestartet. In Standardenzymtests wurde eine Reaktionszeit von 10 Minuten gewählt, zur Bestimmung der

K_m -Werte wurde die Inkubationszeit jeweils so verkürzt, dass selbst bei geringen Substratkonzentrationen noch die Linearität des Reaktionsverlaufs gewährleistet war.

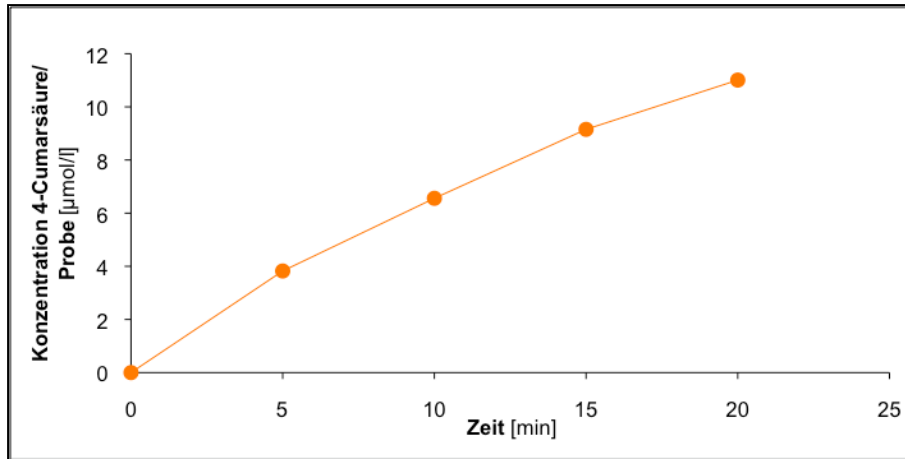


Abb. 61: Abhängigkeit der C4H-Aktivität von der Reaktionszeit

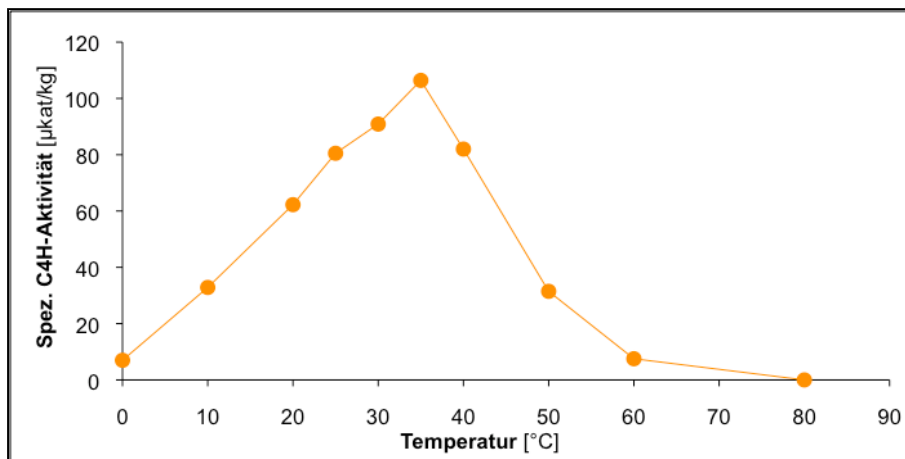


Abb. 62: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der C4H von der Inkubationstemperatur

3.2.2.2 Temperaturoptimum

Das übliche Puffersystem der C4H-Tests ist 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5. Da der pH-Wert des Tris-Puffers jedoch temperaturabhängig ist und sich bei Erwärmen oder Abkühlen um 0,03 Einheiten/°C erhöht bzw. erniedrigt, kann das Temperaturoptimum eines Enzyms nur mit großen Aufwand in Tris/HCl-Puffer ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde 0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 7,5 zur Bestimmung der optimalen Inkubationstemperatur gewählt. Die Mikrosomen-Fraktion wurde nach Entsalzen in eben diesen Puffer umgepuffert.

In einem breiten Temperaturbereich von 0 °C bis 80 °C kann bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten eine optimale Reaktionstemperatur von 35 °C ermittelt werden (Abb. 62).

3.2.2.3 pH- und Puffer-Optimum

Zur Ermittlung des pH- und Pufferoptimums wurde die Mikrosomen-Fraktion wie gewohnt entsalzt, jedoch anschließend nicht mit Puffer, sondern mit demineralisiertem Wasser von der PD10-Säule eluiert. Durch Zugabe der Mikrosomen-Fraktion zum Testansatz wird auf diese Weise zwar die Konzentration des Puffers verringert, der eingestellte pH-Wert aber nicht durch den pH-Wert des Elutionspuffers beeinflusst.

Das pH-Optimum wurde sowohl in 0,5 M Tris/HCl (pH im Reaktionsansatz: 4,3–8,7) als auch in 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (pH im Reaktionsansatz: 5,3–9,0) bei 25 °C ermittelt.

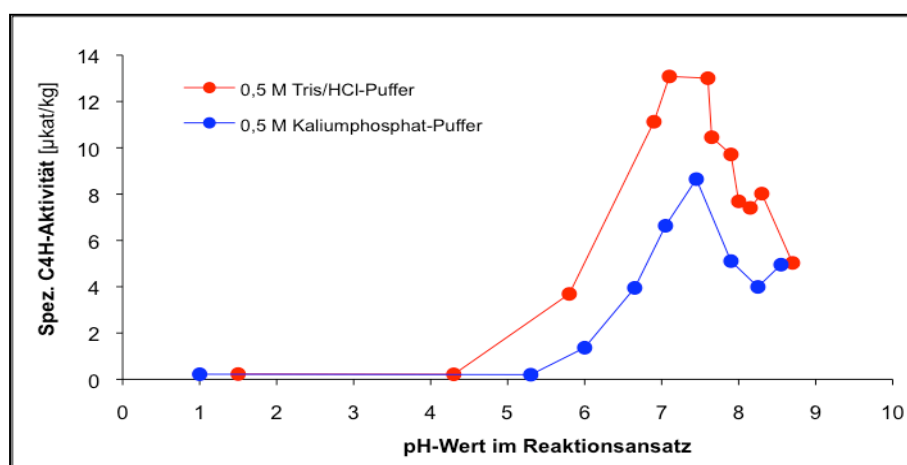


Abb. 63: Spezifische Aktivität der C4H in 0,5 M Tris/HCl-Puffer und 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer bei verschiedenen pH-Werten

Aus Abbildung 63 ist zu erkennen, dass das pH-Optimum in Tris/HCl-Puffer im Bereich von pH 7,0 bis 7,5 liegt und bei geringeren spezifischen Aktivitäten in $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer mit pH 7,5 ermittelt werden konnte.

3.2.2.4 K_m -Wert für *t*-Zimtsäure

In einem Konzentrationsbereich von 2 bis 100 $\mu\text{mol/l}$ *t*-Zimtsäure kann bei einer Reaktionszeit von 2 Minuten und einer Inkubationstemperatur von 25 °C ein apparenter K_m -Wert von 9 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt werden. Wie aus Abbildung 64 zu erkennen ist, stellt sich die Substratsättigung bei etwa 60 $\mu\text{mol/l}$ ein.

Die Berechnung des K_m -Wertes erfolgte mittels Hanes-Woolf-Diagramm unter Berücksichtigung von 8 Bestimmungen je Messwert (Abb. 64 a).

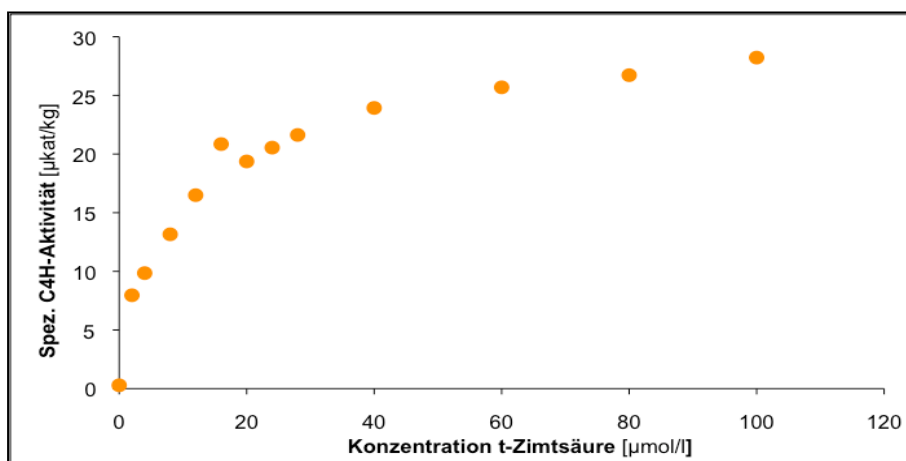


Abb. 64: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der C4H von der *t*-Zimtsäure-Konzentration

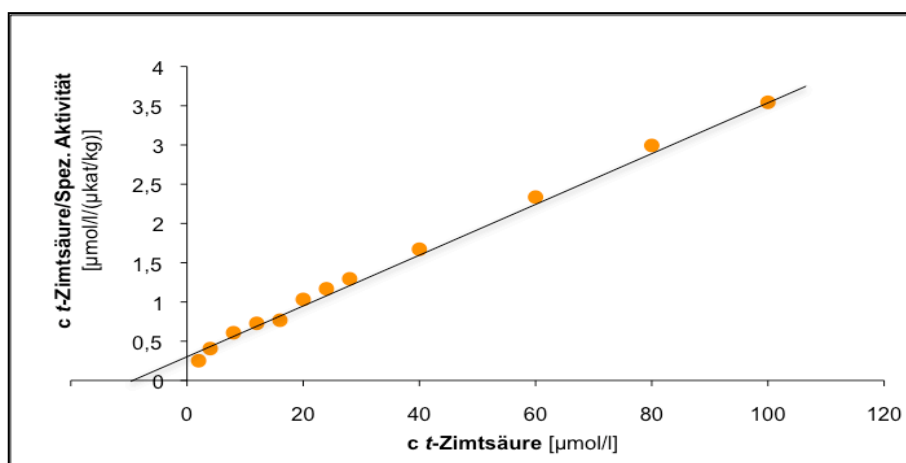


Abb. 64 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 64 nach Hanes-Woolf

3.2.2.5 K_m -Wert für NADPH

Während der Hydroxylierungsreaktion dient das Cosubstrat NADPH als Elektronendonator. Die Testansätze zur Ermittlung des apparenten K_m -Wertes für das Cosubstrat enthielten jeweils zwischen 4 und 200 µmol/l NADPH und 200 µmol/l *t*-Zimtsäure. Die besten Ergebnisse konnte bei einer Inkubationstemperatur von 35 °C und 2-minütiger Reaktionszeit erzielt werden. In die Berechnung gingen 10 Bestimmungen für jeden Messwert ein.

Durch Linearisierung nach Hanes-Woolf lässt sich der K_m -Wert über den Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse berechnen (Abb. 65 a). Für die C4H der Melisse ergibt sich auf diese Weise ein apparenter K_m -Wert für NADPH von 27 µmol/l. Sättigung wird bei etwa 100 µmol/l erreicht (Abb. 65). Bei Konzentrationen von etwa 75 µmol/l stellt sich eine leichte Substrathemmung ein.

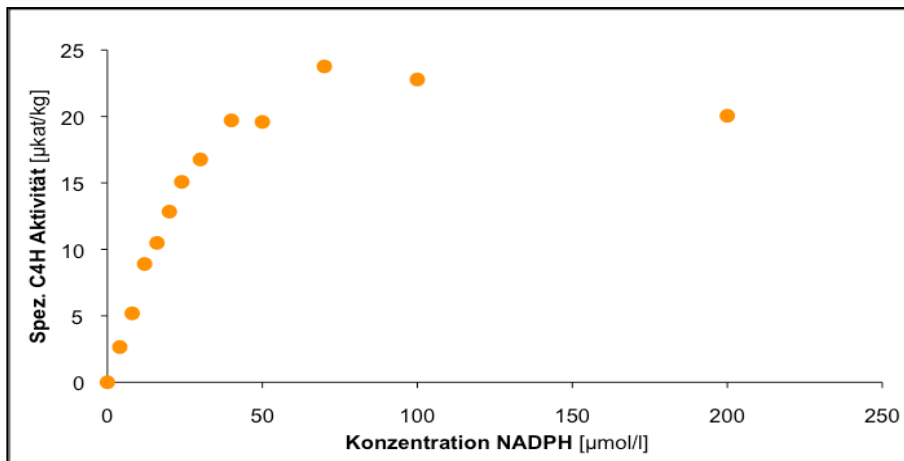


Abb. 65: Substratsättigungskurve der C4H für das Cosubstrat NADPH

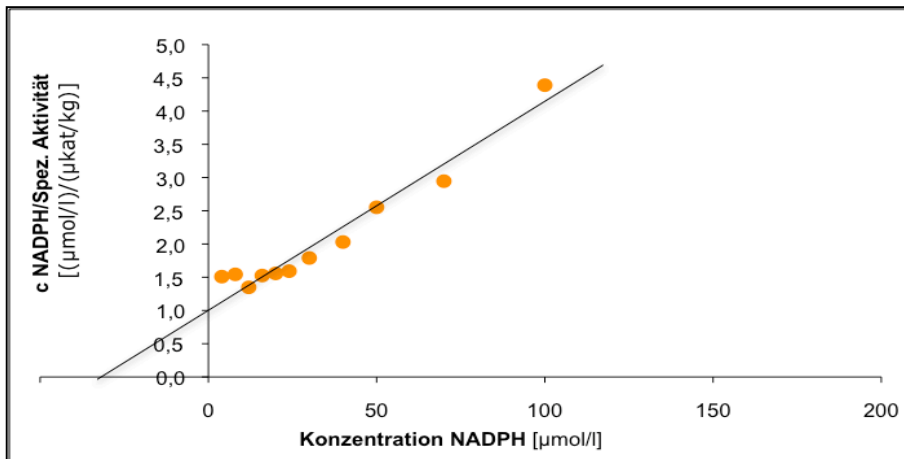


Abb. 65 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 65 nach Hanes-Woolf

3.2.3 Charakterisierung der Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase

Die Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL) setzt *t*-Zimtsäure und ihre hydroxylierten Derivate wie 4-Cumar- und Kaffeesäure zu den entsprechenden CoA-Estern um. Diese Produktbildung kann photometrisch durch Absorptionzunahme bei charakteristischen Wellenlängen verfolgt und zur Berechnung der Enzymaktivität verwendet werden. Die der Berechnung zugrundeliegende Formel ist wie die Zusammensetzung der Enzymtests in Kapitel 2.3.5 zu finden. Die Steigung der Extinktionskurve (ΔE) sollte möglichst zu Beginn der Messung bestimmt werden, da gerade zu Reaktionsbeginn auch bei geringen Substrat- und Cosubstratkonzentrationen eine Linearität der Reaktion gewährleistet ist.

3.2.3.1 Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration

Um die optimale Proteinkonzentration für die Durchführung der Tests zu ermitteln, wurde ein Standardtestansatz mit Konzentrationen zwischen 0,014 und 0,26 mg/ml Protein im Testansatz inkubiert. Im Bereich von 0,014 bis 0,07 mg/ml Protein im Testansatz ist ein annähernd linearer Verlauf der Enzymaktivität erkennbar (Abb. 66).

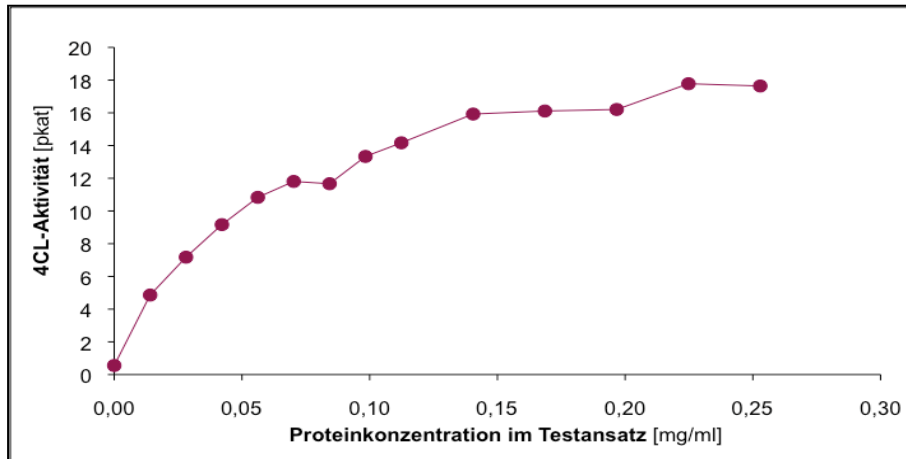


Abb. 66: Abhängigkeit der 4CL-Aktivität von der Proteinkonzentration im Testansatz

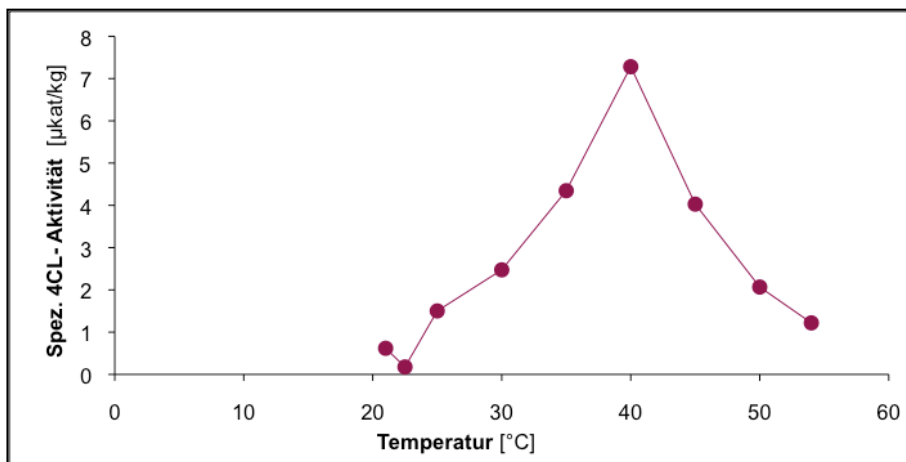


Abb. 67: Abhängigkeit der spezifischen 4CL-Aktivität von der Inkubationstemperatur

3.2.3.2 Temperaturoptimum

Zur Ermittlung des Temperaturoptimums wurde die Umsetzung von Kaffeesäure zu Caffeoyl-CoA in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 54 °C beobachtet. Hierzu wurde der Thermoblock des Spektralphotometers über ein Wasserbad mit Wasser der entsprechenden Temperatur temperiert. Die Küvetten, welche die Testansätze enthielten, wurden bereits vor Reaktionsbeginn ausreichend lange in diesem Thermoblock vorgewärmt.

Aus Abbildung 67 ist zu erkennen, dass die optimale Inkubationstemperatur der 4CL bei 40 °C liegt.

3.2.3.3 pH-Optimum

Im photometrischen Test war die Ermittlung eines pH-Optimums nicht möglich, da es immer wieder zu Trübungen der Testansätze kam, die eine Absorptionsmessung entweder völlig verhinderten oder das Ergebnis soweit beeinflussten, dass eine Auswertung nicht mehr sinnvoll möglich war. Da die Produkte der Reaktion, die hydrophilen CoA-Ester, nicht mit Ethylacetat oder anderen organischen Lösungsmitteln aus dem Testansatz ausgeschüttelt werden können, stand zur Bestimmung der 4CL-Enzymaktivität keine alternative HPLC-Methode zur Verfügung.

Ein pH-Optimum kann folglich nicht angegeben werden.

3.2.3.4 K_m -Wert für Kaffeesäure

Die Umsetzung von Kaffeesäure zu Caffeoyl-CoA kann photometrisch durch Absorptionzunahme bei 346 nm verfolgt werden. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ zur Berechnung der Enzymaktivität beträgt $18 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$.

Der apparente K_m -Wert für Kaffeesäure wurde sowohl durch ein Lineweaver-Burk (Abb. 68 a) als auch ein Hanes-Woolf-Diagramm (Abb. 68 b) bestimmt und liegt in beiden Fällen bei $390 \mu\text{mol/l}$. Eine Sättigung für Kaffeesäure stellt sich erst bei etwa $900 \mu\text{mol/l}$ ein (Abb. 68). Jeder Messwert errechnete sich durch die Mittelung von 6 Bestimmungen.

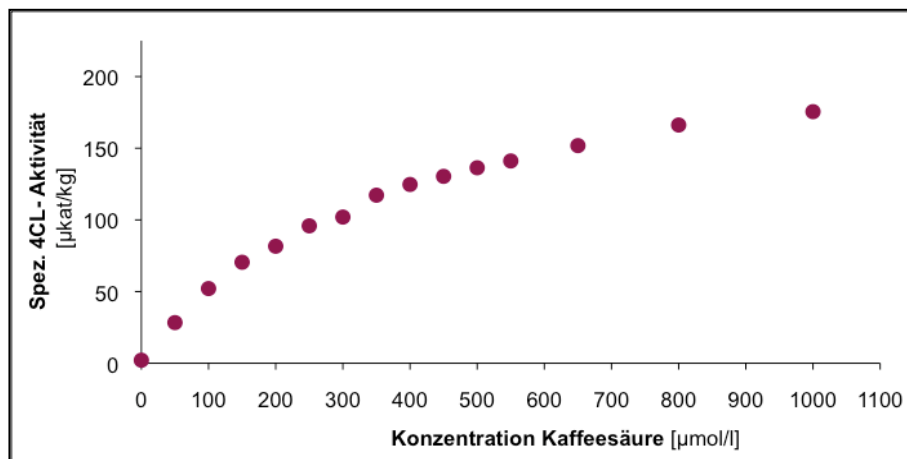


Abb. 68: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der 4CL von der Kaffeesäure-Konzentration

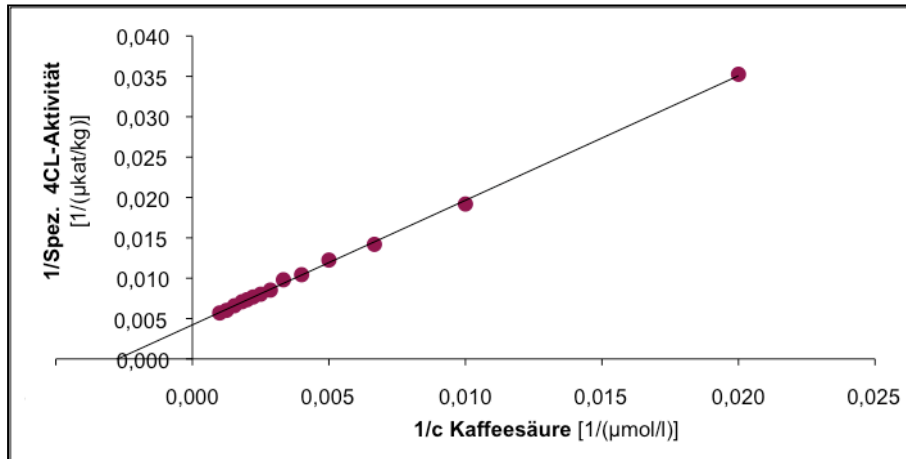


Abb. 68 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 68 nach Lineweaver-Burk

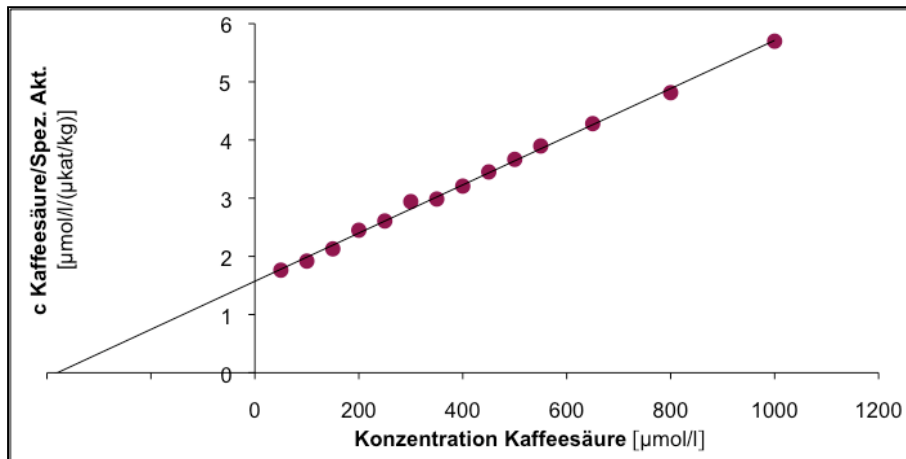


Abb. 68 b: Linearisierung der Daten aus Abb. 68 nach Hanes-Woolf

3.2.3.5 K_m -Wert für 4-Cumarsäure

4-Cumarsäure wird katalysiert durch 4CL zu 4-Cumaroyl-CoA umgesetzt. Diese Umsetzung kann durch Absorptionzunahme des Produktes bei 333 nm gemessen werden. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt $21 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$.

Obwohl 4-Cumarsäure als *das* Substrat der 4CL gilt, konnte im photometrischen Test keine Umsetzung zu 4-Cumaroyl-CoA beobachtet werden.

3.2.3.6 K_m -Wert für ATP

Tatsächlich wurden sowohl in Testansätzen mit ATP-Konzentrationen zwischen $62,5 \mu\text{mol/l}$ und $3,75 \text{ mmol/l}$ als auch in Testansätzen ohne jegliches ATP scheinbare 4CL-Aktivitäten gemessen, deren genaue Ursache unklar ist (vgl. Abb. 69). Auch ein Entsalzen des RE brachte das Phänomen nicht zum Verschwinden.

Die Angabe eines K_m -Wertes für das Cosubstrat ATP ist aus diesem Grund nicht möglich.

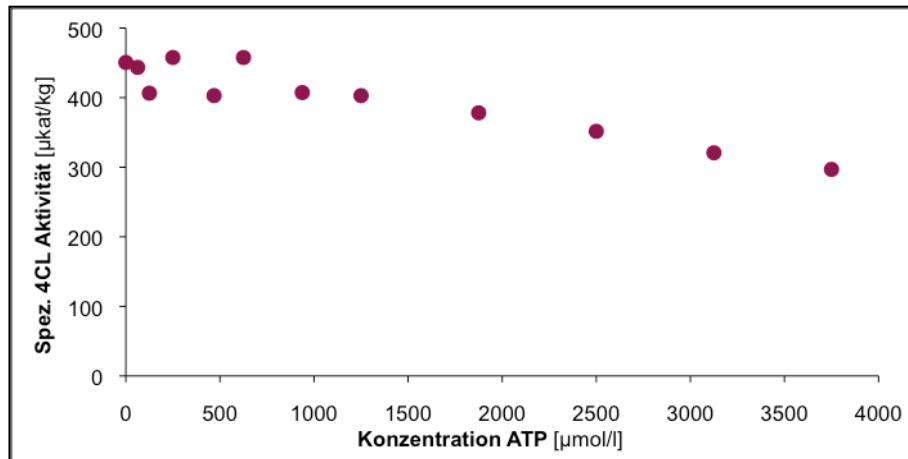


Abb. 69: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der 4CL von der ATP-Konzentration im Testansatz

3.2.3.7 K_m -Wert für Coenzym A

Ein apparenter K_m -Wert für Coenzym A kann ebenfalls nicht angegeben werden. Es konnte zwar eine Substrat-Sättigungskurve bestimmt werden (Abb. 70), die jedoch weder nach der Methode von Lineweaver-Burk noch nach Hanes-Woolf sinnvoll auswertbar war.

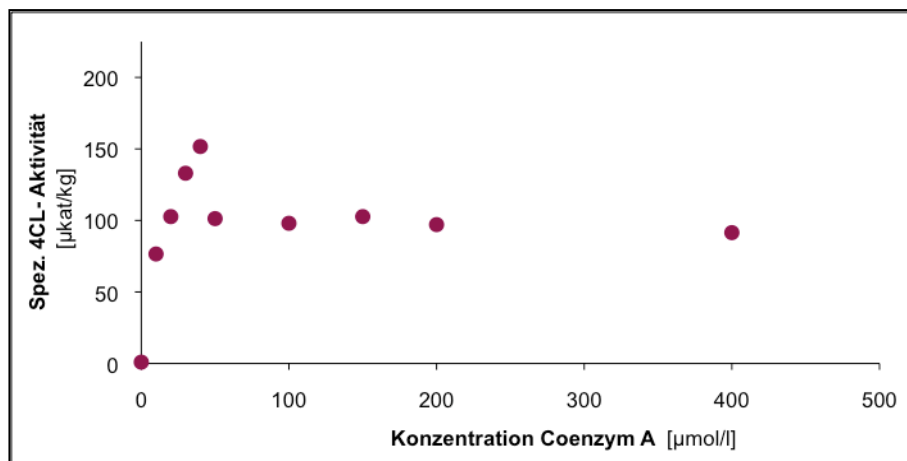


Abb. 70: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der 4CL von der Coenzym A-Konzentration im Testansatz

3.2.3.8 Anmerkung

Bei der Bestimmung aller apparenten K_m -Werte ist davon auszugehen, dass die Werte durch andere, im Rohextrakt enthaltene Enzyme verfälscht sind und nicht die wahren K_m -Werte und Substratsättigungskonzentrationen des Enzyms widerspiegeln. Darüber hinaus können mehrere Isoformen eines Enzyms mit unterschiedlichen kinetischen Parametern nebeneinander vorliegen.

Klonierung und Charakterisierung der 4CL sollen es ermöglichen, die wahren Werte und Substratspezifitäten zu ermitteln.

3.2.4 Charakterisierung der Tyrosin Aminotransferase

Die Tyrosin Aminotransferase (TAT) ist das erste Enzym auf dem Weg von L-Tyrosin zu 4-Hydroxyphenyllactat (pHPL), welches anschließend durch die Rosmarinsäure Synthese mit dem Hydroxyzimtsäure-Derivat verestert wird.

TAT katalysiert die Umsetzung der Aminosäure L-Tyrosin mit 2-Oxoglutarat als Aminoakzeptor zu 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP). Bei diesem Enzym handelt es sich um ein Holoenzym mit Pyridoxalphosphat als prosthetischer Gruppe.

Tests zur Bestimmung der Enzymcharakteristika der TAT wurden mit entsalztem Proteinhextrakt angesetzt. Eine genaue Beschreibung des Standardenzymtests findet sich unter 2.3.6.

3.2.4.1 Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration und Inkubationszeit

Bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten konnte selbst in Reaktionsansätzen mit einer Proteinkonzentration von mehr als 1 mg/ml noch ein Anstieg der Aktivität beobachtet werden (Abb. 71). Im Standardenzymtest wurden üblicherweise Konzentrationen von 0,1 bis 0,4 mg/ml Protein eingesetzt.

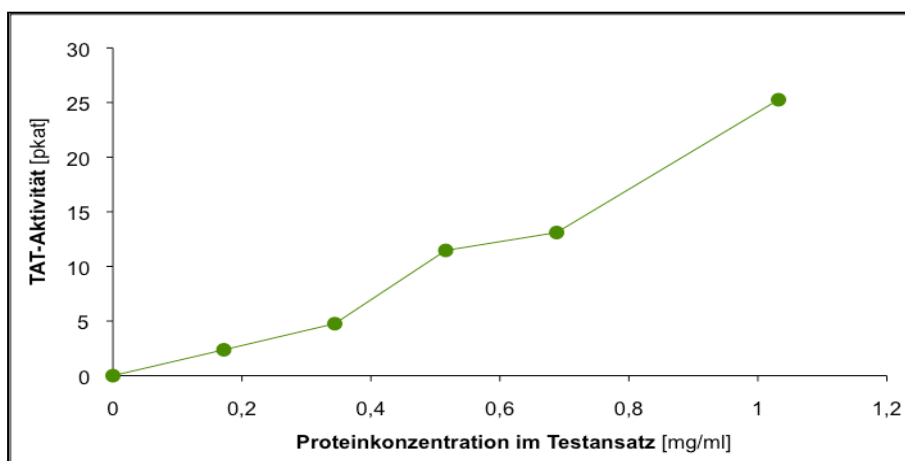


Abb. 71: Abhängigkeit der TAT-Aktivität von der Proteinkonzentration im Testansatz

Reaktionsansätze mit einem Proteingehalt von 0,25 mg/ml wurden über einen Zeitraum von 1, 2, 5, 10, 15 und 30 Minuten bei 40 °C inkubiert. Selbst nach einer Reaktionszeit von mehr als 15 Minuten konnte noch eine Zunahme der Produktbildung beobachtet werden (Abb. 72).

Ebenso wie bei der Untersuchung der übrigen Enzyme wurde auch hier in allen Fällen sichergestellt, dass selbst bei geringen Substratkonzentrationen durch die Wahl einer geeigneten Reaktionszeit ein linearer Reaktionsverlauf gewährleistet war.

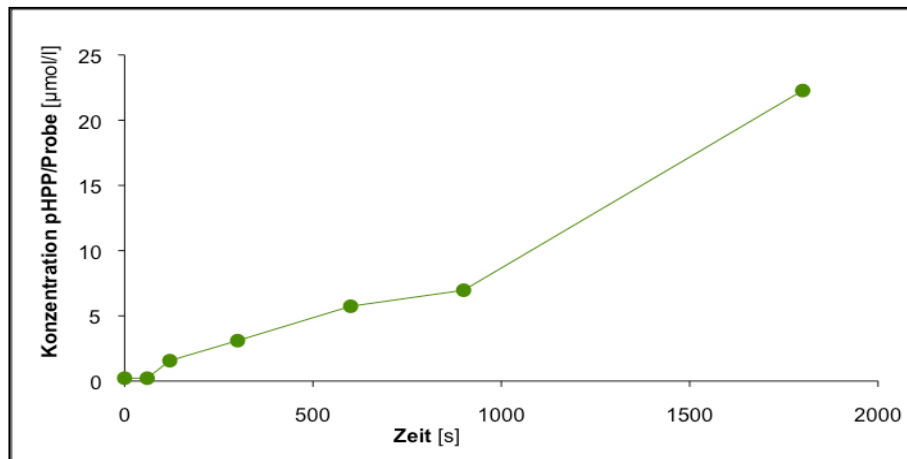


Abb. 72: Abhängigkeit der TAT-Enzymaktivität von der Inkubationszeit

2.3.4.2 Temperaturoptimum

Enzymtests für die Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurden in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C inkubiert. Um eine Beeinflussung der Enzymaktivität während der Vorwärmzeit zu vermeiden, wurden diese Tests nicht wie üblich durch Zugabe von L-Tyrosin-Lösung gestartet sondern mit RE.

Bei einer Reaktionszeit von 10 Minuten liegt das Temperaturoptimum der TAT bei 60 °C (Abb. 73).

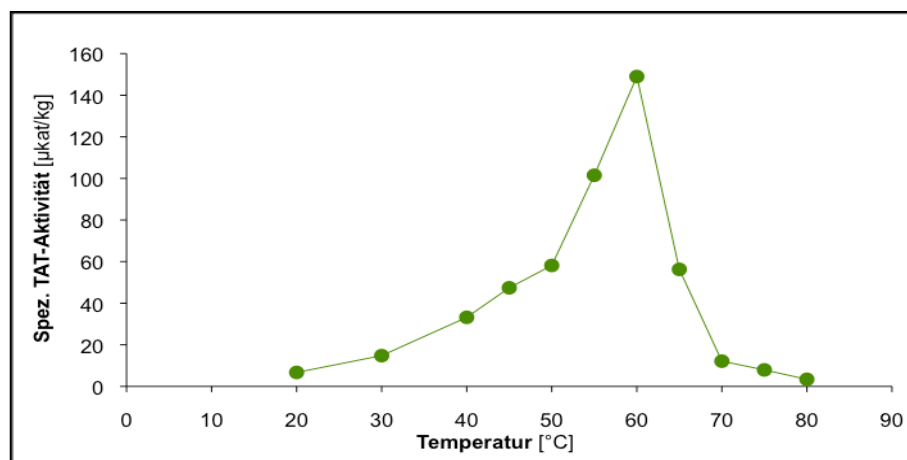


Abb. 73: Temperaturabhängigkeit der TAT-Aktivität

3.2.4.3 pH-Optimum

Da das Substrat der Reaktion, L-Tyrosin, in 0,5 M HCl gelöst ist, wurde für den Standardtestansätze ein 1 M Tris/HCl-Puffer pH 9,0 gewählt. Die hohe Konzentration des Puffers soll ein Absinken des pH-Wertes nach Zugabe des Substrates verhindern und damit die Stabilität des eingestellten pH-Wertes und die Aktivität des Enzyms gewährleisten.

Das pH-Optimum wurde gleichfalls in 1 M Tris/HCl-Puffer in einem Bereich von pH 5,6 bis 9,5 in der Reaktion bestimmt. Innerhalb dieses Bereiches ist ein breites pH-Optimum um pH 8,5 zu erkennen (Abb. 74). Dies entspricht dem pH-Wert, der in Standardenzymtests gemessen werden kann.

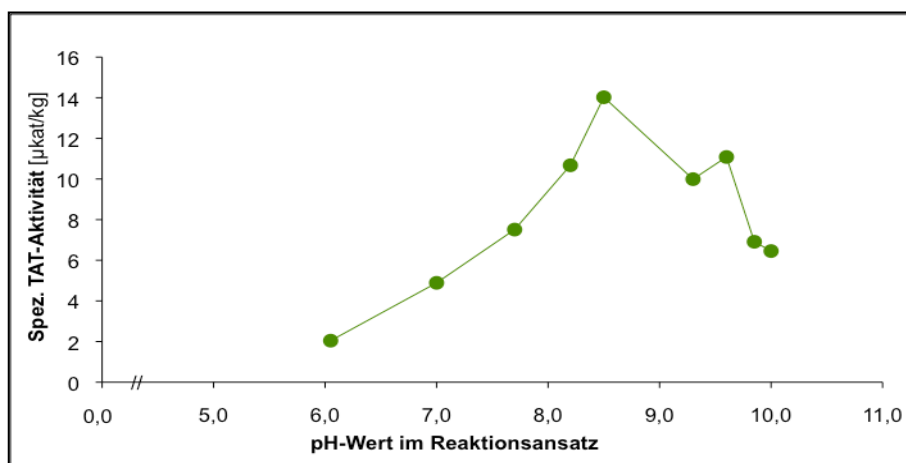


Abb. 74: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der TAT vom pH-Wert des Reaktionsansatzes

3.2.4.4 K_m -Wert für L-Tyrosin

L-Tyrosin kann abhängig vom pH-Wert der Lösung als Zwitterion vorliegen, d.h. das Proton der Carboxylgruppe lagert sich an das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms der Amino-Gruppe an. Am isoelektrischen Punkt liegen alle Moleküle als Zwitterionen vor. Dieser wird für L-Tyrosin bei pH 5,66 erreicht. Als sogenanntes inneres Salz ist L-Tyrosin nach außen ungeladen (Abb. 75) und daher weder in Wasser noch in Ethanol, Ether und Aceton löslich. Lediglich in Säuren und Laugen kann die Aminosäure leicht gelöst werden. Aus diesem Grund wird der TAT-Test mit einer Lösung von L-Tyrosin in 0,5 M HCl gestartet. Dennoch kann im Testansatz selbst bei kurzen Reaktionszeiten von lediglich 60 Sekunden keine Substratsättigung für L-Tyrosin erreicht werden, da Substratkonzentrationen von mehr als 6 mmol/l im Testansatz nicht löslich sind und bei dieser Konzentration noch keine Substratsättigung erreicht wird (Abb. 76). Daher kann der apparente K_m -Wert nur über eine lineare Auftragung abgeschätzt werden. Trägt man die Daten aus Abbildung 76 nach einer Lineweaver-Burk-Linearisierung auf (Abb. 76 a), ergibt sich ein apparenter K_m -Wert von 7,2 mmol/l.

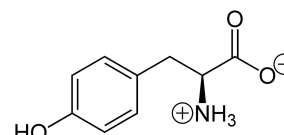


Abb. 75: L-Tyrosin

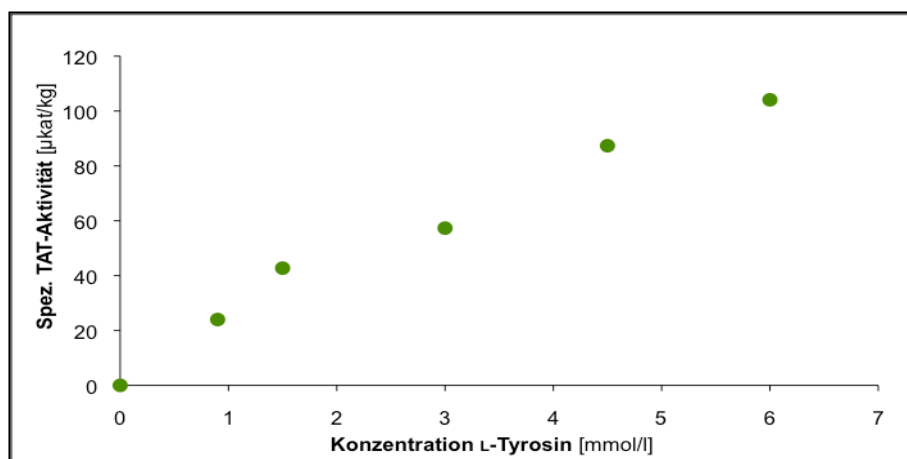


Abb. 76: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der TAT von der L-Tyrosin-Konzentration

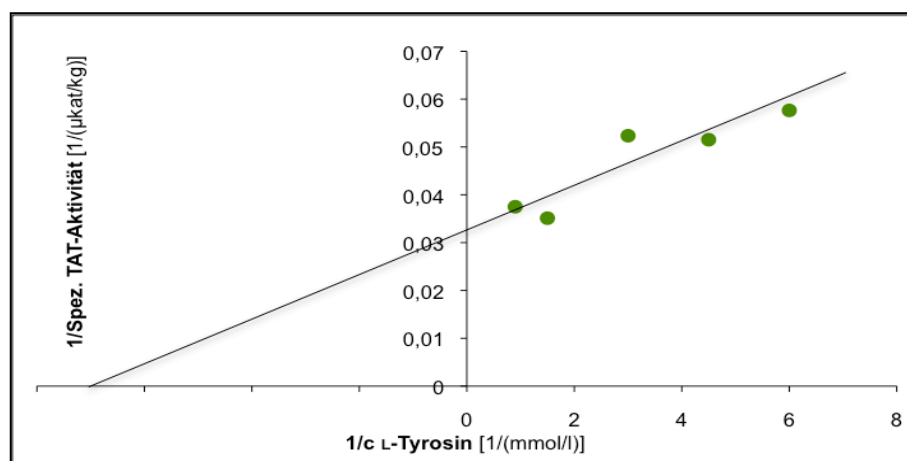


Abb. 76 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 76 nach Lineweaver-Burk

3.2.4.5 K_m -Wert für 2-Oxoglutarat

Zur Bestimmung des K_m -Wertes eines Cosubstrates muss die Konzentration des Substrates im Sättigungsbereich vorliegen. Nur so kann eine Beeinflussung der Aktivität des Enzyms durch Änderungen der Substratkonzentration ausgeschlossen werden. Da L-Tyrosin nicht ausreichend hoch konzentriert werden kann, kann der apparente K_m -Wert für 2-Oxoglutarat nur näherungsweise ermittelt werden.

Zur Bestimmung wurde die 2-Oxoglutarat-Konzentration des Testansatzes zwischen 4 und 640 $\mu\text{mol/l}$ variiert (Abb. 77). Um auch bei kleinen Substratkonzentrationen noch die Linearität des Reaktionsverlaufs zu gewährleisten, wurde die Inkubationszeit bei einer Reaktionstemperatur von 45 °C auf 2 Minuten verkürzt. Der apparente K_m -Wert für 2-Oxoglutarat kann durch die Methode von Lineweaver-Burk mit 40 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 77 a) und durch die Methode von Hanes-Woolf mit 28 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt werden. Eine Substratsättigung wird bei etwa 160 $\mu\text{mol/l}$ des Cosubstrates erreicht (Abb. 77 b). In jeden Messwert flossen die Ergebnisse von 5 Bestimmungen ein.

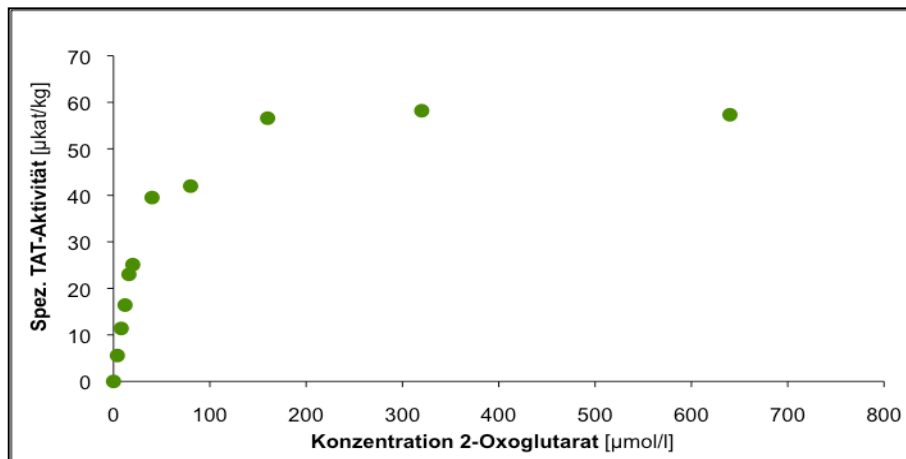


Abb. 77: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der TAT von der 2-Oxoglutarat-Konzentration

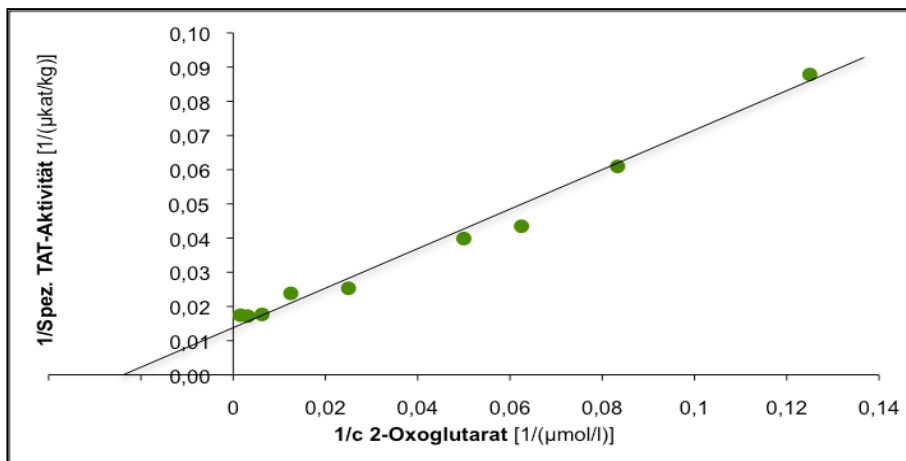


Abb. 77 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 77 nach der Methode von Lineweaver-Burk

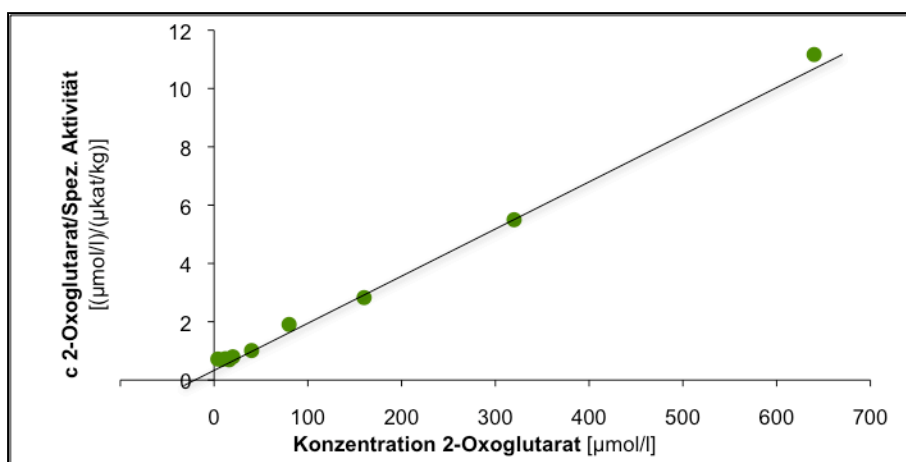


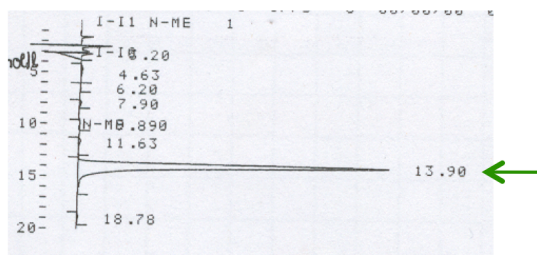
Abb. 77 b: Linearisierung der Daten aus Abb.77 nach Hanes-Woolf

3.2.5 Charakterisierung der Hydroxyphenylpyruvat Reduktase

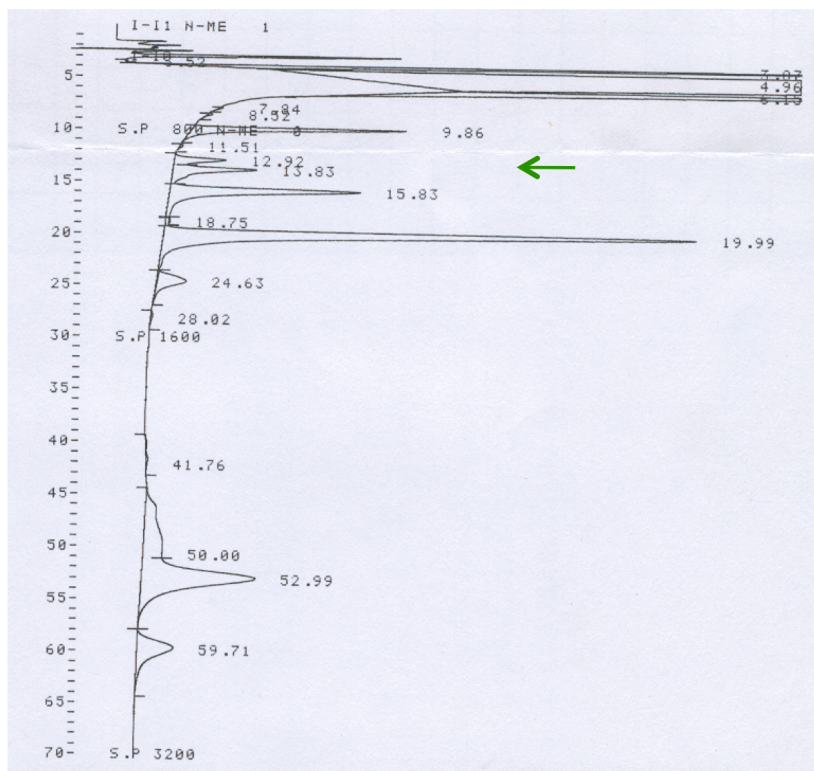
Die Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR) katalysiert die Reduktion eines Hydroxyphenylpyruvats zum entsprechenden Lactat. Als Reduktionsäquivalente werden NADH und NADPH gleichermaßen als Cosubstrate akzeptiert. Von der HPPR wird nicht nur das durch die TAT gebildete 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) als Substrat umgesetzt, sondern auch 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat (DHPP) und ähnliche Substanzen, die über eine freie Hydroxygruppe an Position 4 des aromatischen Ringes verfügen (Häusler et al., 1991).

4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) wird katalysiert durch die HPPR zu 4-Hydroxyphenyllactat (pHPL) reduziert, DHPP entsprechend zu 3,4-Dihydroxyphenyllactat (DHPL). Die entstandenen Reaktionsprodukte können mit Ethylacetat aus dem angesäuerten Testansatz ausgeschüttelt und schließlich durch HPLC-Messung quantifiziert werden.

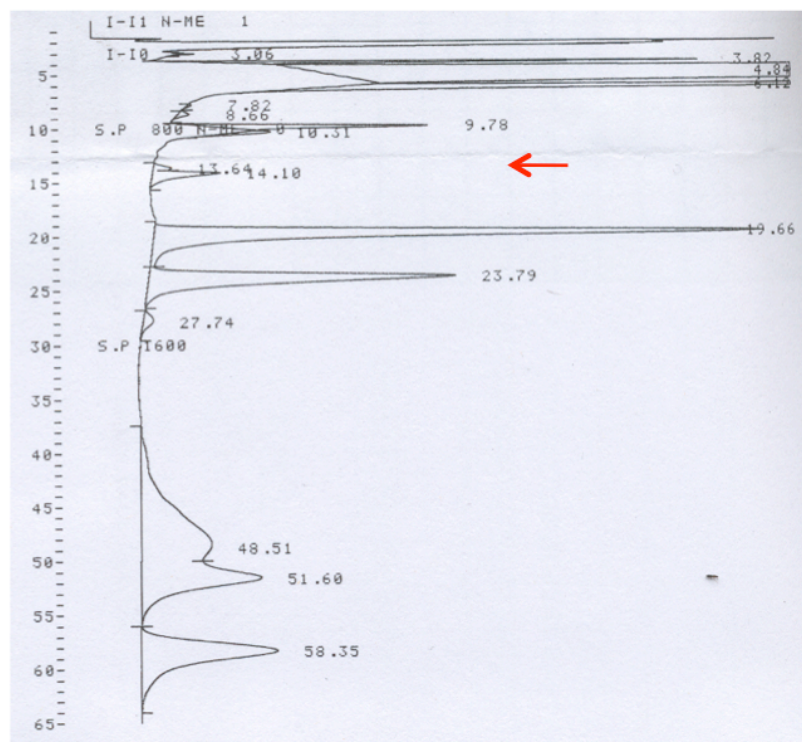
100 $\mu\text{mol/l}$
pHPL



Standard-
enzymtest
(t = 10 min)



Nullprobe
(t = 0 min)



**500 µmol/l
pHPP**
in 0,1 M K_2HPO_4 /
 KH_2PO_4 -Puffer;
angesäuert und
ausgeschüttelt mit
Ethylacetat

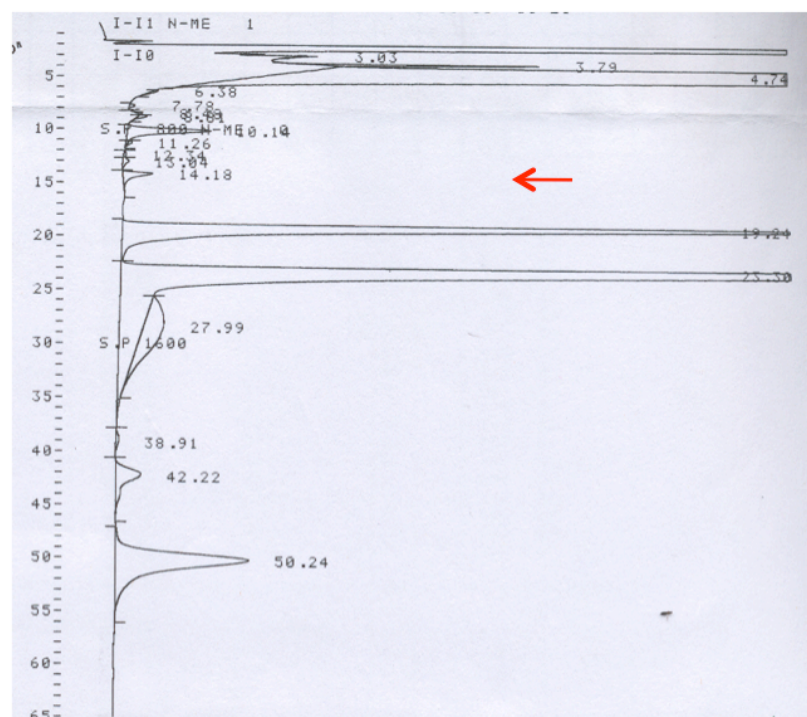


Abb. 78: HPLC-Chromatogramme des HPPR-Tests

Allerdings war die Detektion kleiner Umsatzmengen schwierig, da eine Abtrennung der kleinen Peaks vom großen Substratpeak kaum zufriedenstellend möglich war. Dies ist bei genauer Betrachtung der abgebildeten Chromatogramme gut zu erkennen (Abb. 78). Auf diese ungenaue Integration können auch die Schwankungen der Enzymaktivität im

Bereich gesättigter Substratkonzentrationen oder Ausreißer in Messreihen zurückgeführt werden.

Da die Auswertung der HPLC nur bei Wahl eines sehr hydrophilen Laufmittels (10 % MeOH angesäuert mit 0,01 % *o*-Phosphorsäure) und dementsprechend langen Läufen möglich war, wurden die K_m -Werte für die Substrate pHPP und 3,4-Dihydroxyphenyllactat alleine mit dem Cosubstrat NADH ermittelt.

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte sowohl aus dem Proteinrohextrakt (RE) als auch nach Anreicherung des Enzyms durch Fällung mit 40 % Sättigung an Ammoniumsulfat durch einen HPLC-Test. Detektiert wurde das entstandene Produkt bei 280 nm oder empfindlicher bei 220 nm.

3.2.5.1 Anreicherung der HPPR durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Mithilfe der fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung können Proteine angereichert werden. Dies ist beispielsweise bei geringen Enzymaktivitäten im RE sinnvoll. Durch schrittweise Erhöhung der Ammoniumsulfat-Konzentration der Enzymlösung werden die Proteine nach und nach ausgefällt und abgetrennt. Die genaue Durchführung der Fällung ist unter 2.3.9 beschrieben.

Die Abtrennung der HPPR gelang mit 40 bis 60 % (V/V) Sättigung an Ammoniumsulfat. Es wurde eine Anreicherung von 350 % im Vergleich zur spezifischen Aktivität der HPPR im RE erreicht.

3.2.5.2 Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration und Inkubationszeit

Um die optimale Proteinkonzentration zu bestimmen, wurden Doppelproben bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C für eine Reaktionszeit von 10 Minuten inkubiert. Die Testansätze enthielten Proteinkonzentrationen zwischen 0,23 und 4,60 mg/ml.

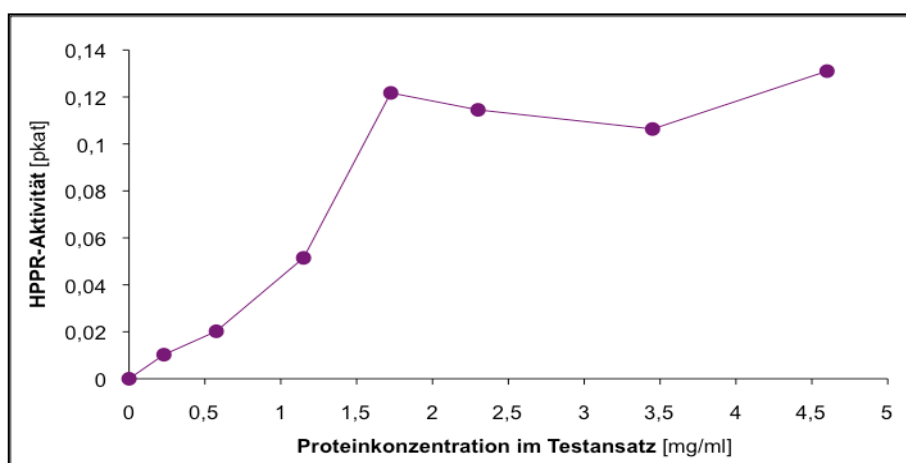


Abb. 79: Abhängigkeit der Aktivität der HPPR von der Proteinkonzentration im Testansatz

Abbildung 79 zeigt, dass über den gesamten Testbereich eine Zunahme der HPPR-Aktivität beobachtet werden kann. Um eine lineare Abhängigkeit der Reaktionsausbeute

von der Proteinkonzentration zu gewährleisten, sollte eine Proteinkonzentration von 1,2 mg/ml nicht überschritten werden.

Werden Reaktionsansätze, die 0,46 mg/ml Protein enthalten, bei 30 °C für verschiedene Zeitintervalle inkubiert, resultiert die in Abbildung 80 wiedergegebene Kurve. Eine annähernd lineare Zunahme der Produktbildung kann über einen Zeitraum von bis zu 30 Minuten beobachtet werden.

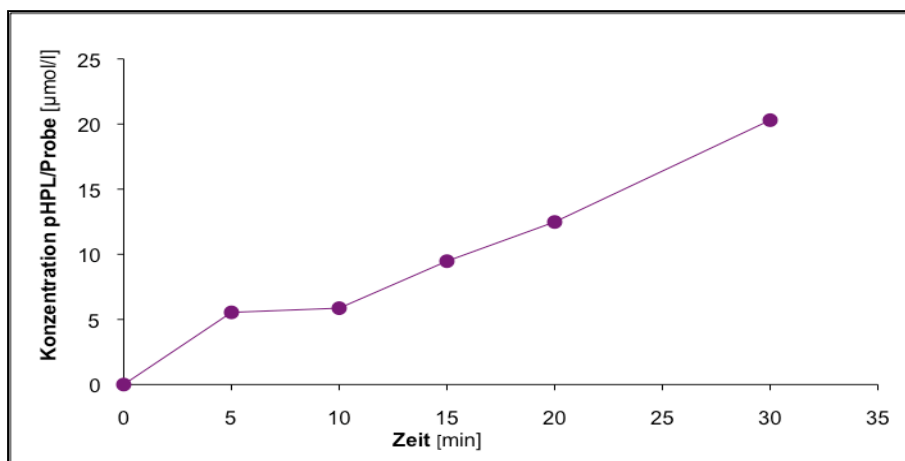


Abb. 80: Abhängigkeit der Produktbildung von der Inkubationszeit

Sowohl zur Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration wie auch zur Ermittlung der idealen Inkubationszeit wurde Proteinrohextrakt verwendet. Entsprechende Tests wurden auch mit angereichertem Enzym wiederholt. So konnte sichergestellt werden, dass selbst bei geringen Substrat- oder Cosubstratkonzentrationen durch Wahl einer entsprechenden Inkubationszeit eine Linearität der Reaktion gewährleistet war.

3.2.5.3 Temperaturoptimum

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionstemperatur wurden Testtemperaturen zwischen 0 °C und 70 °C gewählt. Für jede gewählte Temperatur wurden Doppelproben bestimmt. Im Verlauf der Reaktionsdurchführung wurden die Ansätze bei unterschiedlichen Temperaturen etwa 10 Minuten vortemperierte und anschließend für weitere 10 Minuten inkubiert. Jeder Testansatz enthielt 0,5 mM pHPP als Substrat und 0,5 mM NADH als Cosubstrat.

Die resultierende Kurve ist in Abbildung 81 wiedergegeben. Das Temperaturoptimum der HPPR liegt bei 45 °C. Der erneute Anstieg der Enzymaktivität oberhalb von 60 °C kann durch enzymunabhängige chemische Reaktionen erklärt werden.

Ogleich dies nicht dem Temperaturoptimum entspricht, wurden alle weiteren Enzymcharakteristika bei 30 °C bestimmt.

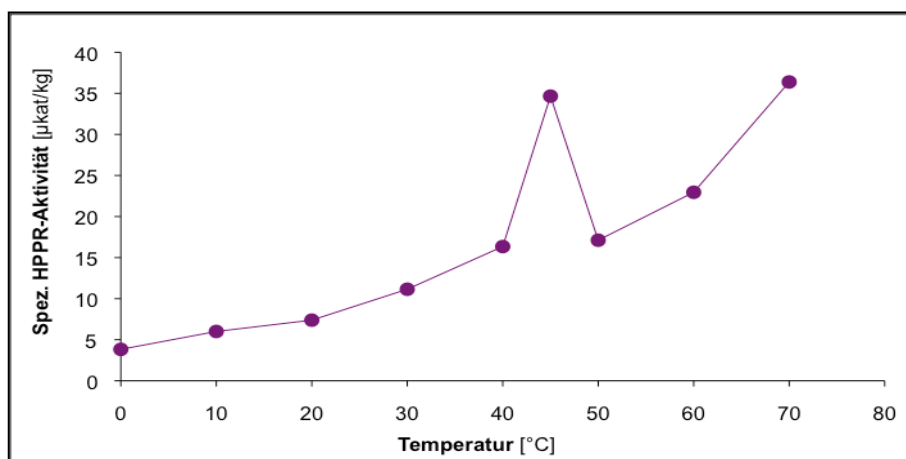


Abb. 81: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPPR von der Inkubationstemperatur

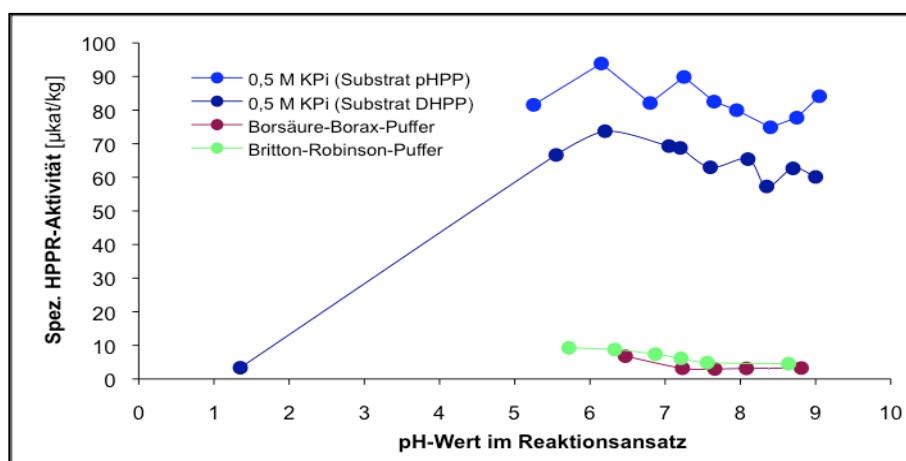


Abb. 82: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPPR vom pH-Wert des Testansatzes in verschiedenen Puffersystemen: 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (KPi), Borsäure-Borax-Puffer und Britton-Robinson-Puffer

3.2.5.4 pH-Optimum

Das pH-Optimum der HPPR sollte in 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer in einem Bereich von pH 1,35 bis 9,0 (gemessen im Reaktionsansatz) ermittelt werden. Die ersten Reaktionsansätze wurden bei 30 °C für 10 Minuten inkubiert. Abgesehen von einer wesentlich schwächeren Enzymaktivität bei pH 1,35 konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Ergebnissen der übrigen Messpunkte festgestellt werden. Obwohl die Linearität des Reaktionsverlaufs bei 10-minütiger Inkubation bei 30 °C gewährleistet war (Abb. 81), wurde die Reaktionszeit in einem nächsten Test auf 5 Minuten verkürzt. Das Ergebnis entsprach demjenigen des vorigen Tests und konnte in weiteren Tests nicht nur mit dem Substrat pHPP, sondern auch mit DHPP bestätigt werden.

Auch in Borsäure-Borax-Puffer (pH in Reaktion: 6,5–8,8) und Britton-Robinson-Puffer (0,04 M Phosphorsäure, 0,04 M Essigsäure und 0,04 M Borsäure, eingestellt mit NaOH)

(pH im Reaktionsansatz: 5,7–8,6) konnte kein pH-Optimum ermittelt werden. Es wurde lediglich beobachtet, dass die Enzymaktivität der HPPR in diesen beiden Puffersystemen deutlich geringer ist als in $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (Abb. 82).

3.2.5.5 K_m -Wert für 4-Hydroxyphenylpyruvat

Der apparente K_m -Wert für pHPP wurde bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C bestimmt. In einem Bereich von 4 bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ pHPP wurden Doppelproben pipettiert. Diese enthielten jeweils 0,5 mM NADH als Cosubstrat. Inkubiert wurde bei Verwendung von Proteinrohextrakt (0,215 mg Protein im Reaktionsansatz) für eine Reaktionszeit von 5 Minuten. Enthielten die Reaktionsansätze hingegen angereichertes Enzym (0,19 mg im Testansatz) war eine Inkubationszeit von 60 Sekunden ausreichend.

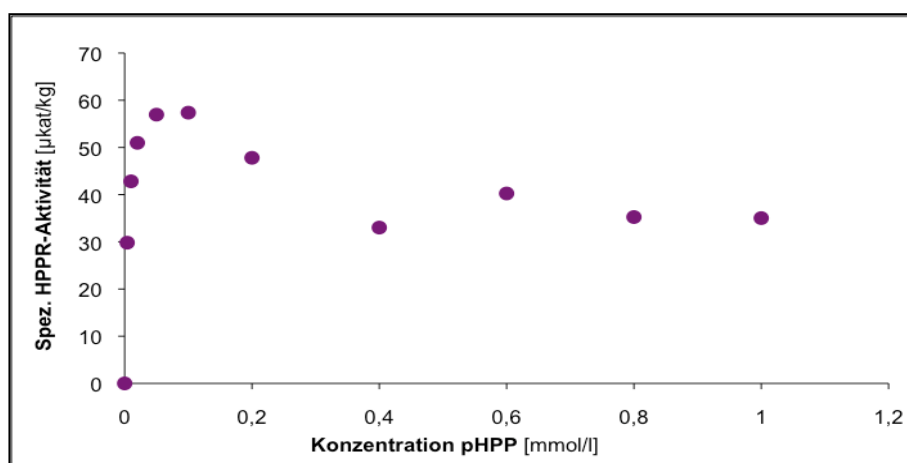


Abb. 83: Substratsättigungskurve der HPPR für pHPP

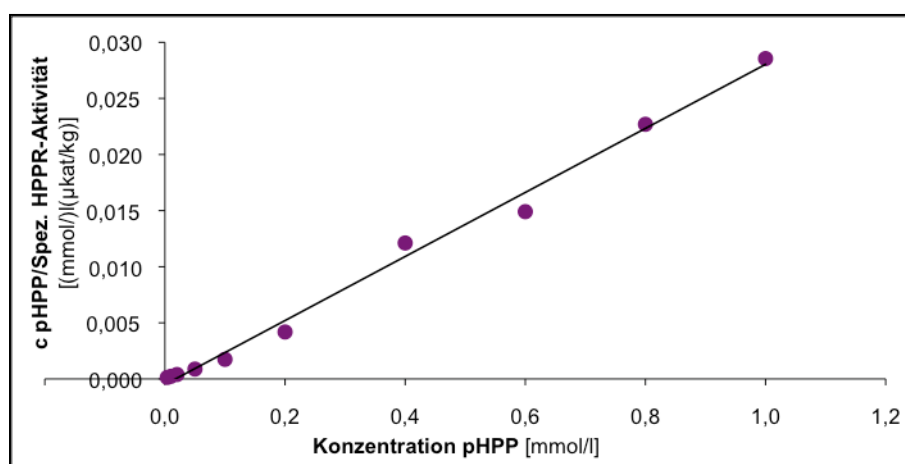


Abb. 83 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 83 nach Hanes-Woolf

Abbildung 83 zeigt den Kurvenverlauf, der durch Mittelung von vier Messwerten resultiert. Eine leichte Substrathemmung kann oberhalb einer pHPP-Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ beobachten werden. Durch Hanes-Woolf-Auftragung (Abb. 83 a) der Werte kann ein apparenter K_m -Wert von 5 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden.

2.3.5.6 K_m -Wert für 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat

Die Bestimmung des apparenten K_m -Wertes für 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat (DHPP) kann, nach Linearisierung nach der Methode von Hanes-Woolf, mit 28 $\mu\text{mol/l}$ angegeben werden (Abb. 84 a). Die Substratsättigungskurve zeigt, dass eine Substratsättigung erst bei etwa 400 $\mu\text{mol/l}$ DHPP erreicht wird (Abb. 84).

Der Wert wurde in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 800 $\mu\text{mol/l}$ DHPP ermittelt. Jeder Testansatz enthielt 0,5 mM NADH als Cosubstrat. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte für 60 Sekunden bei 30 °C mit angereichertem Enzym (0,19 mg im Testansatz). Insgesamt gingen 6 Bestimmungen in die Berechnung der Werte ein.

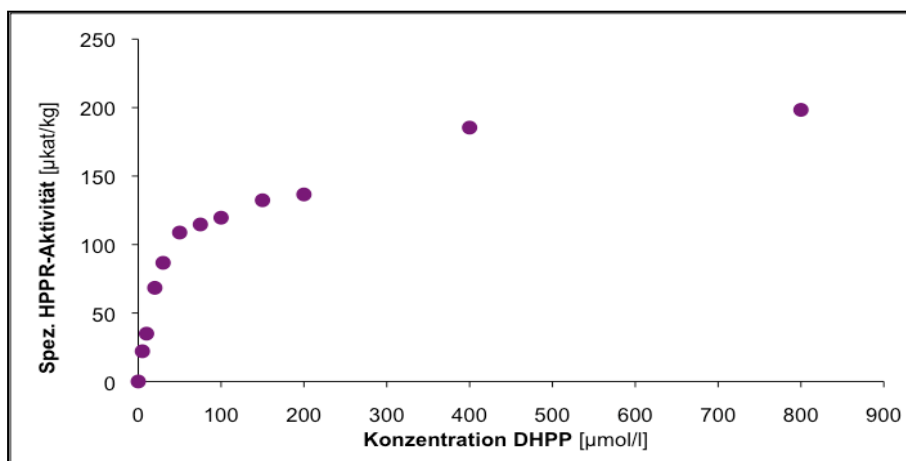


Abb. 84: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPPR von der DHPP-Konzentration des Testansatzes

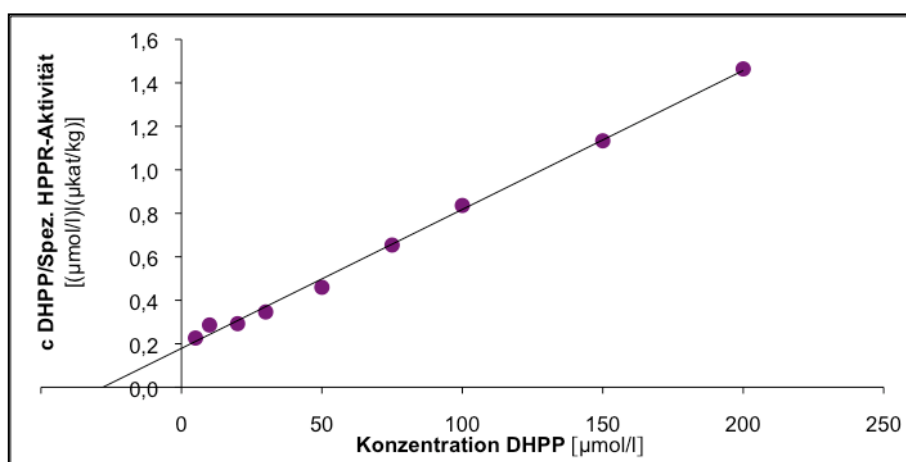


Abb. 84 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 84 nach Hanes-Woolf

3.2.5.7 K_m -Wert für NADH

Die Bestimmung des apparenten K_m -Wertes für NADH und NADPH wurde durch die bereits zuvor beschriebene unzureichende Peak-Trennung im Verlauf der HPLC-Vermessung stark erschwert.

In einem Konzentrationsbereich von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 2 mmol/l NADH im Testansatz konnten dennoch unter Verwendung von angereichertem Enzym und mit pHPP als Substrat ein apparenter K_m -Wert und eine Substratsättigungskonzentration für das Cosubstrat bestimmt werden. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C und einer Inkubationszeit von 60 Sekunden erhalten.

In Abbildung 85 ist eine Substrat-Sättigungskurve dargestellt, die aus 8 Bestimmungen pro Messwert errechnet wurde. Der mit der Hanes-Woolf-Methode bestimmte apparen- te K_m -Wert für NADH beträgt 90 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 85 a). Substratsättigung wird etwa bei 500 $\mu\text{mol/l}$ erreicht.

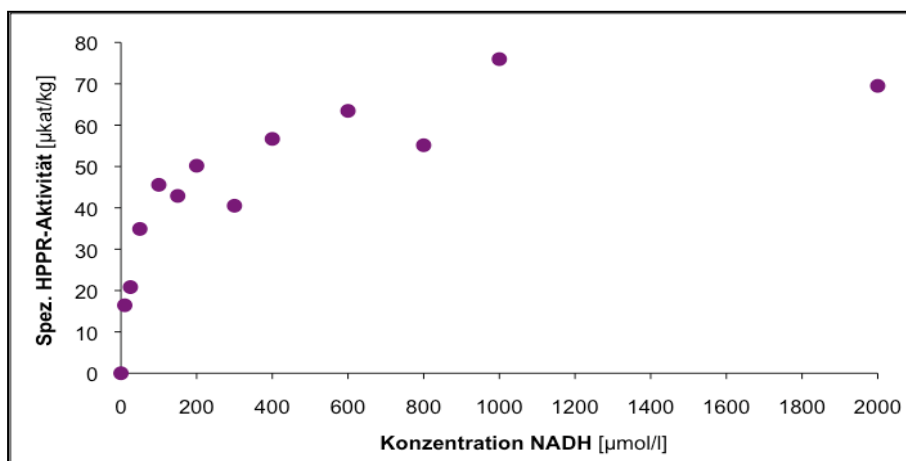


Abb. 85: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPPR von der NADH-Konzentration im Testansatz

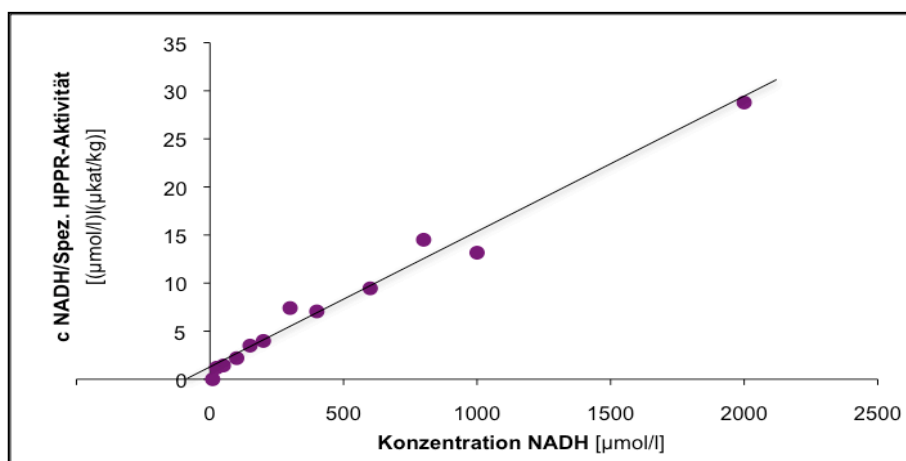


Abb. 85 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 85 nach Hanes-Woolf

3.2.5.8 K_m -Wert für NADPH

Der apparente K_m -Wert für NADPH konnte lediglich aus Doppelproben bestimmt werden. Obwohl der Versuch mehrfach, auch unter Veränderung der Inkubationstemperatur, Reaktionszeit, Protein- und Substratkonzentration wiederholt wurde, war keine weitere Testreihe darunter, die hätte sinnvoll ausgewertet werden können. Selbst durch die Wahl einer anderen HPLC-Säule (ThermoQuest Hypersil Division, 5 μ HyPURITY™ Elite C18) konnte die Integration des Produktpeaks nicht verbessert werden.

Die besten Ergebnisse wurden in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 2000 $\mu\text{mol/l}$ NADPH im Testansatz erhalten (Abb. 86). Die Reaktionsansätze enthielten 100 $\mu\text{mol/l}$ pHPP und 0,28 mg angereichertes Enzym. Inkubiert wurde 60 Sekunden bei 30 °C. Nach Linearisierung der Ergebnisse nach der Methode von Hanes-Woolf kann ein apparenter K_m -Wert für NADPH von 58 $\mu\text{mol/l}$ angenommen werden (Abb. 86 a).

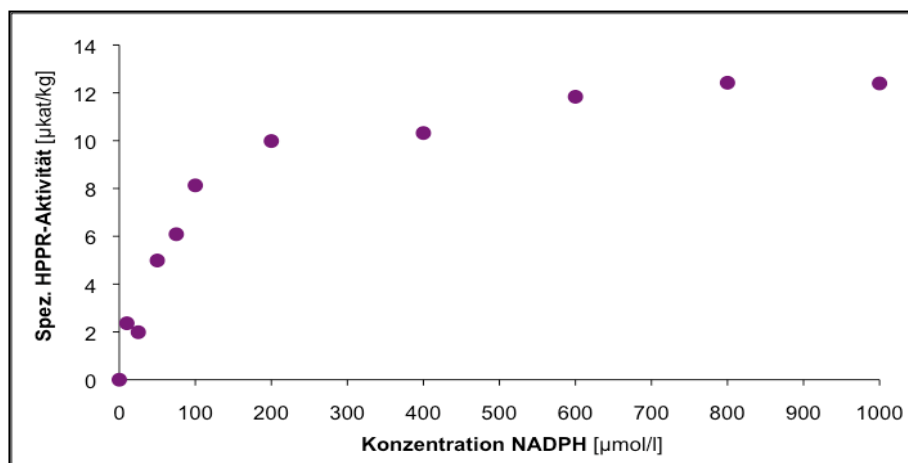


Abb. 86: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der HPPR von der NADPH-Konzentration im Reaktionsansatz

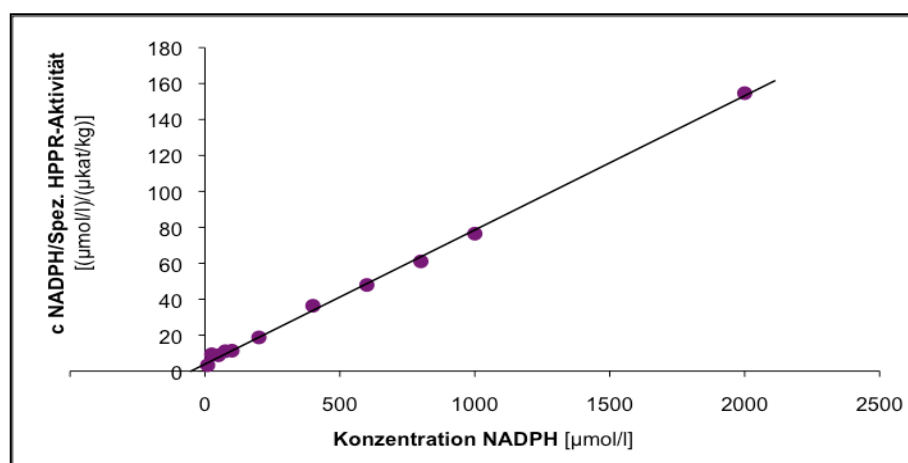


Abb. 86 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 86 nach Hanes-Woolf

3.2.6 Charakterisierung der Rosmarinsäure Synthase

Die Rosmarinsäure Synthase (RAS) katalysiert die Veresterung der CoA-aktivierten Hydroxyzimtsäure mit dem Produkt der HPPR oder anderen Hydroxyphenyllactaten unter Freisetzung von Coenzym A.

Da die RAS sowohl auf Hydroxycinnamoyl- wie Hydroxyphenyllactatseite verschieden substituierte Substrate akzeptiert, können auf enzymatischem Weg nicht nur Rosmarinsäure, sondern eine ganze Vielzahl rosmarinsäureartiger Ester synthetisiert werden (Abb. 87).

Die aus Suspensionskulturen von *Coleus blumei* untersuchte, isolierte und heterolog exprimierte RAS war in der Lage Hydroxyphenyllactate mit freier Hydroxylgruppe in Position 4 umzusetzen. Zwei von diesen, nämlich 4-Hydroxyphenyllactat (pHPL) und 3,4-Dihydroxyphenyllactat (DHPL), wurden auch für die Charakterisierung der RAS aus *Melissa officinalis*-Suspensionskulturzellen verwendet. Von den beiden Stereoformen der Hydroxyphenylmilchsäuren werden von der RAS lediglich die R(+)-Stereoisomere als Substrate akzeptiert. Die S(-)-Form trägt im Falle des DHPL sogar zu einer Hemmung der Reaktion bei (Petersen, 1991). Da DHPL bislang kommerziell nicht erhältlich ist, musste das benötigte DHPL in unserem Labor durch Esterspaltung aus Rosmarinsäure gewonnen werden (eine genaue Beschreibung findet sich in Kapitel 2.3.11). Demzufolge stand für Enzymtests das reine R(+)-Isomer zur Verfügung. Anders beim pHPL. Dieses wurde als Racemat von der Firma Sigma bezogen. Obwohl in Enzymtests dieses Racemat eingesetzt wurde, beziehen sich die in Reaktionsansätzen enthaltenen pHPL-Konzentrationen stets nur auf den Anteil des R(+)-Stereoisomers.

Als Hydroxycinnamoyl-Derivate wurden routinemäßig Caffeoyle- und 4-Cumaroyl-CoA eingesetzt. Ein anderes geeignetes Substrat wäre Cinnamoyl-CoA, dessen Umsetzung durch die RAS der Melisse nicht getestet wurde.

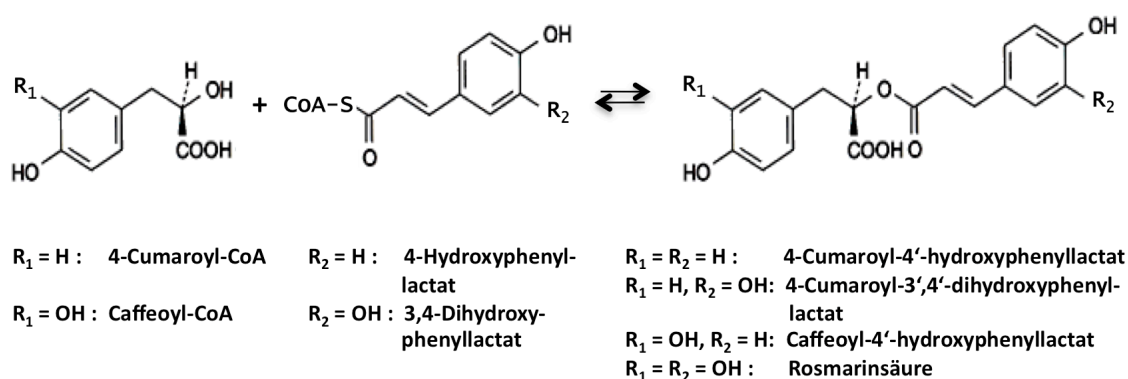


Abb. 87: Reaktion der Rosmarinsäure Synthase mit verschiedenen Substraten und die dabei entstehenden Reaktionsprodukte (Rosmarinsäure bzw. rosmarinsäureartige Ester)

Zur Messung der RAS-Aktivität steht ein HPLC-Test zur Verfügung, der in Kapitel 2.3.8 beschrieben ist. Tests zur allgemeinen Enzymcharakterisierung wie Enzymaktivität im

Kulturverlauf, Temperatur- und pH-Optimum wurden stets mit den Substraten Caffeoyl-CoA und pHPL angesetzt. Das Produkt der Reaktion, Caffeoyl-4'-hydroxyphenyllactat, konnte bei 333 nm detektiert werden und war als externer Standard in ausreichender Menge vorhanden.

3.2.6.1 Ermittlung der optimalen Proteinkonzentration

In Standardreaktionsansätzen konnte bei 10-minütiger Inkubationszeit bis zu einer Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml ein linearer Verlauf der Produktbildung beobachtet werden (Abb. 88).

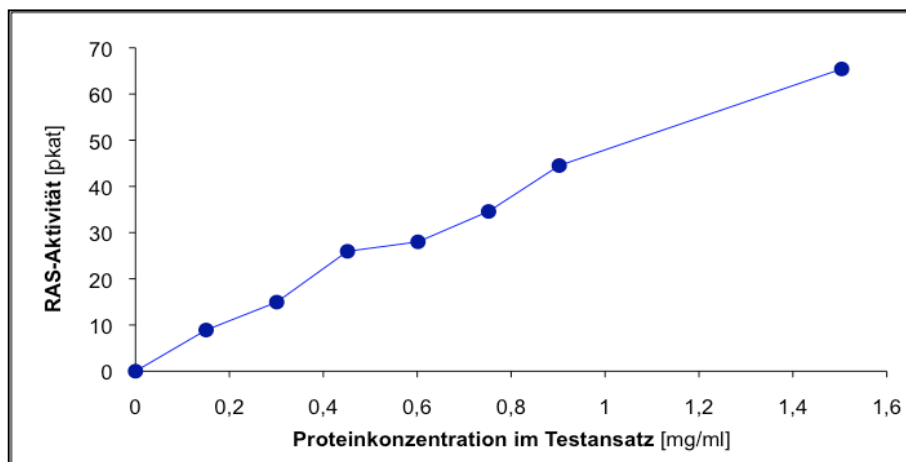


Abb. 88: Abhängigkeit der RAS-Aktivität von der Proteinkonzentration im Testansatz

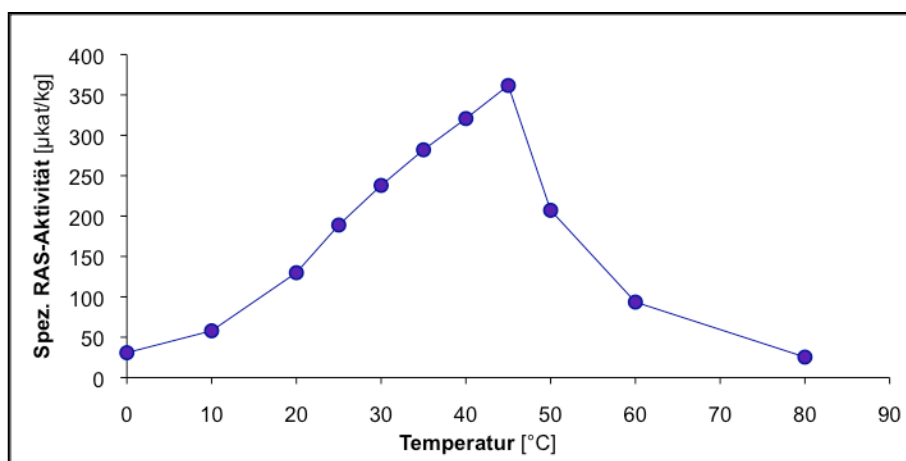


Abb. 89: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der Inkubationstemperatur

3.2.6.2 Temperaturoptimum

In einem Temperaturbereich zwischen 0 °C und 85 °C konnte die optimale Reaktionstemperatur der RAS bei 45 °C ermittelt werden (Abb. 89).

3.2.6.3 pH-Optimum

Das pH-Optimum der RAS wurde in 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer in einem Bereich von pH 5,45 bis pH 8,50 im Reaktionsansatz bestimmt. Wie aus Abbildung 90 hervorgeht, kann bei einer Temperatur von 30 °C und einer Inkubationszeit von 10 Minuten das pH-Optimum im Bereich von pH 7,0 angegeben werden.

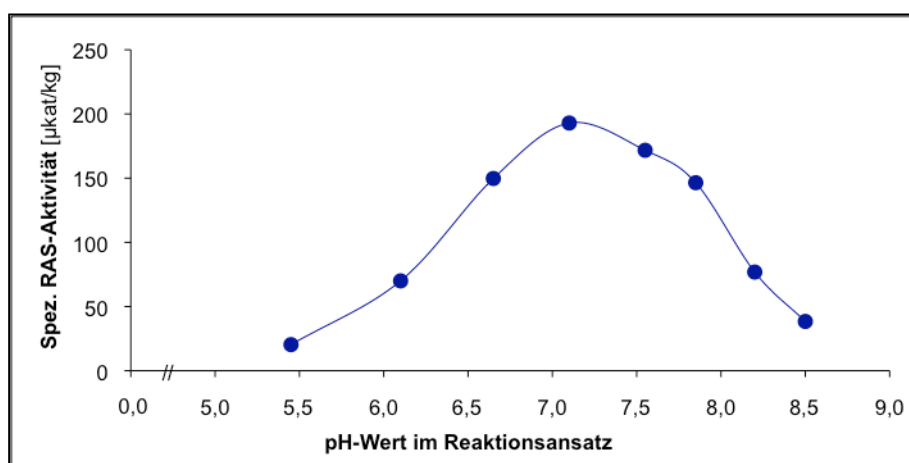


Abb. 90: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS vom pH-Wert im Testansatz

3.2.6.4 K_m -Werte für Caffeoyle-CoA

Zur Ermittlung des apparenten K_m -Wertes für Caffeoyle-CoA (CaffCoA) ist bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C bereits eine Reaktionszeit von 60 Sekunden ausreichend. Da die CoA-Ester der Hydroxyzimtsäuren, genau wie DHPL, nicht kommerziell verfügbar waren, mussten sie aus Vorstufen synthetisiert werden. Hierfür wurde eine leicht abgewandelte Synthesevorschrift nach Stöckigt und Zenk (1975) verfolgt. Das genaue Syntheseprotokoll findet sich zusammen mit einer Anleitung für die Reinigung der entstandenen Reaktionsprodukte in Kapitel 2.3.10.

Die Bestimmung des apparenten K_m -Wertes für Caffeoyle-CoA erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 180 $\mu\text{mol/l}$. Jeder Reaktionsansatz von 125 μl enthielt 0,4 mmol/l pHPL. Die Sättigungskurve für Caffeoyle-CoA weist einen schnellen Übergang in den Sättigungsbereich auf (bei etwa 25 $\mu\text{mol/l}$, vergleiche Abb. 91). Durch Linearisierung nach Hanes-Woolf lässt sich der K_m -Wert über den Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse berechnen (Abb. 91 a). Für Caffeoyle-CoA kann in Kombination mit pHPL als zweitem Substrat ein apparenter K_m -Wert von 3 $\mu\text{mol/l}$ angegeben werden.

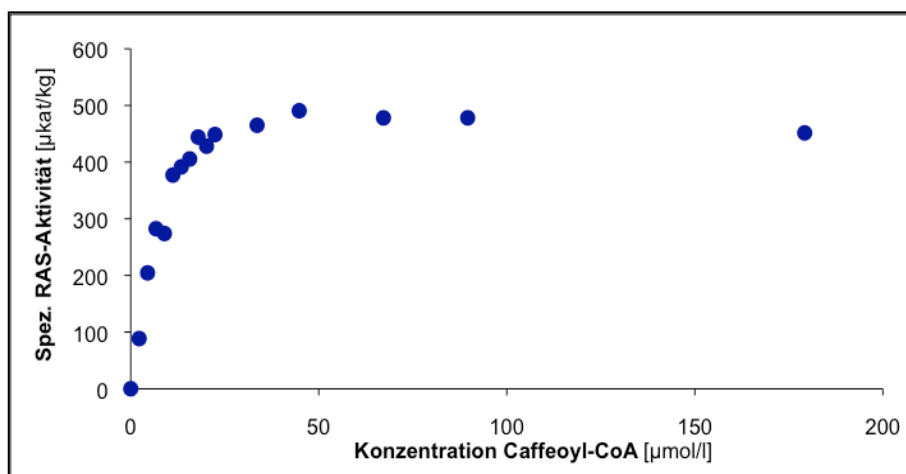


Abb. 91: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der Caffeoyl-CoA-Konzentration des Reaktionsansatzes mit pHPL als zweitem Substrat

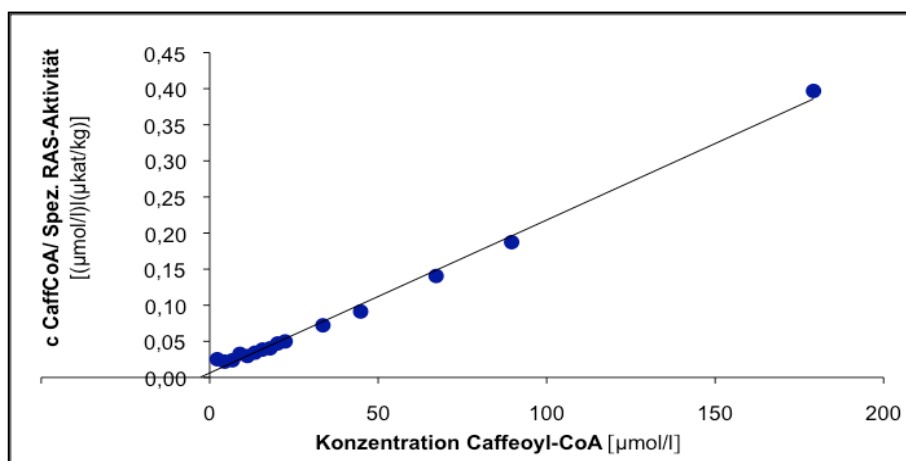


Abb. 91 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 91 nach Hanes-Woolf

Wird anstelle von pHPL 3,4-Dihydroxyphenyllactat als Substrat zur Verfügung gestellt, entsteht durch Veresterung mit Caffeoyl-CoA Rosmarinsäure (vgl. Abb. 87). Der K_m -Wert des Caffeoyl-CoAs für die Reaktion mit DHPL konnte in einem Bereich von 0,36 bis 120 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden. DHPL war in allen Reaktionsansätzen in einer Konzentration von 0,4 mmol/l enthalten.

Der apparente K_m -Wert dieser Reaktion ist 6 $\mu\text{mol/l}$ (errechnet nach Hanes-Woolf unter Einbeziehung von 3 Messungen) (Abb. 92 a). In diesem Fall wird die Substratsättigung bei etwa 30 $\mu\text{mol/l}$ erreicht (Abb. 92).

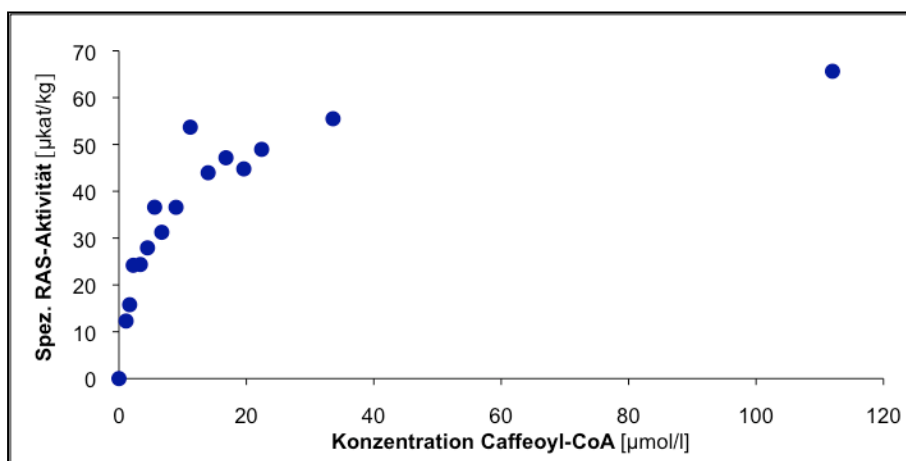


Abb. 92: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der Caffeoyl-CoA-Konzentration mit DHPL als zweitem Substrat

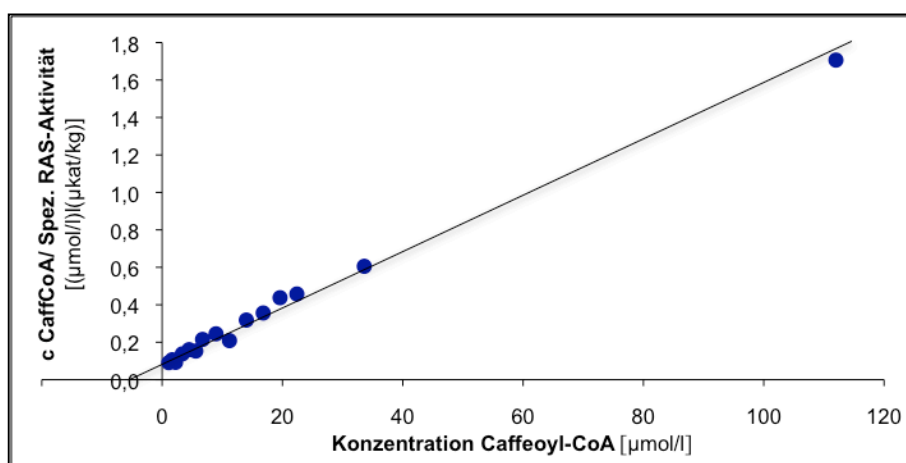


Abb. 92 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 92 nach Hanes-Woolf

3.2.6.5 K_m -Werte für 4-Cumaroyl-CoA

Von Petersen und Alfermann (1988) konnte durch Untersuchung der RAS in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* gezeigt werden, dass 4-Cumaroyl-CoA (pCCoA) das bevorzugte Substrat der RAS auf der Hydroxycinnamoyl-Seite ist. Dafür sprachen nicht nur die höheren Affinitäten, sondern auch die bevorzugte Umsetzung in Konkurrenzexperimenten mit Caffeoyl-CoA.

In einem Konzentrationsbereich von 0,6 bis 60 µmol/l konnte bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C und einer Inkubationszeit von 60 Sekunden mit pHPL als Hydroxyphenyllactat (0,4 mM) ein apparenter K_m -Wert von 6 µmol/l errechnet werden (Methode nach Hanes-Woolf) (Abb. 93 a). Wie aus Abbildung 93 ersichtlich, wird Substratsättigung bei etwa 15 µmol/l erreicht.

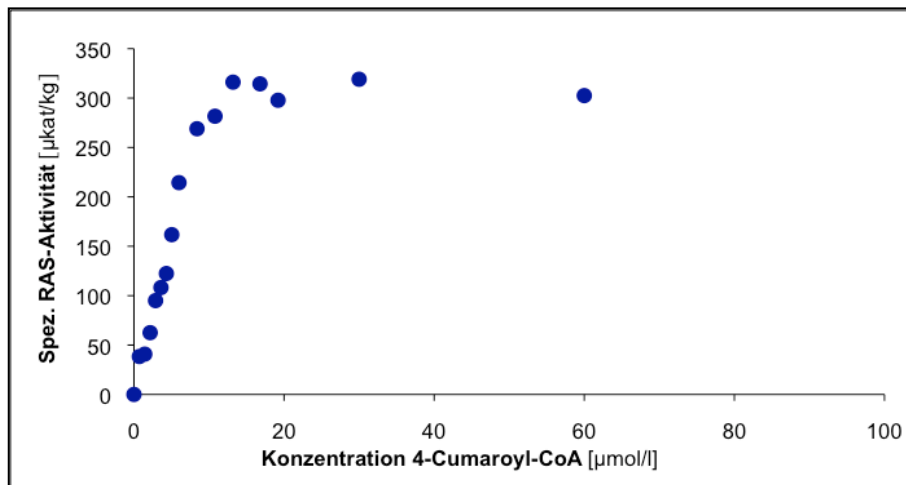


Abb. 93: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der 4-Cumaroyl-CoA-Konzentration im Testansatz mit pHPL als zweitem Substrat

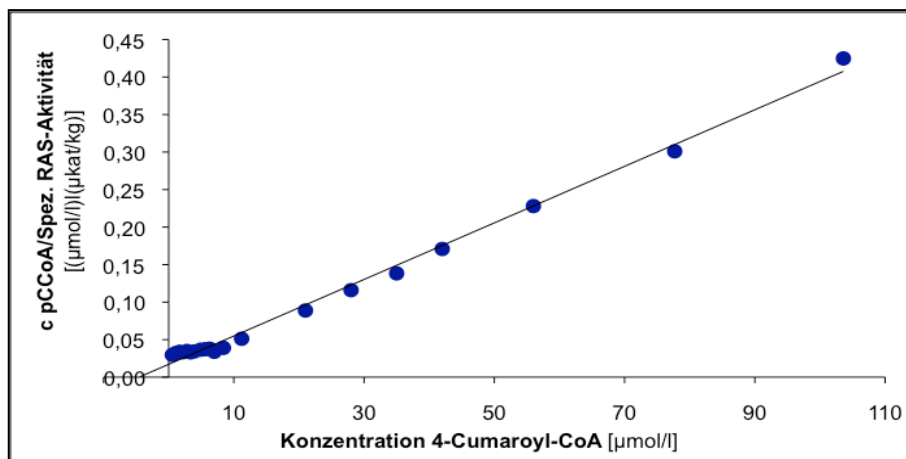


Abb. 93 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 93 nach Hanes-Woolf

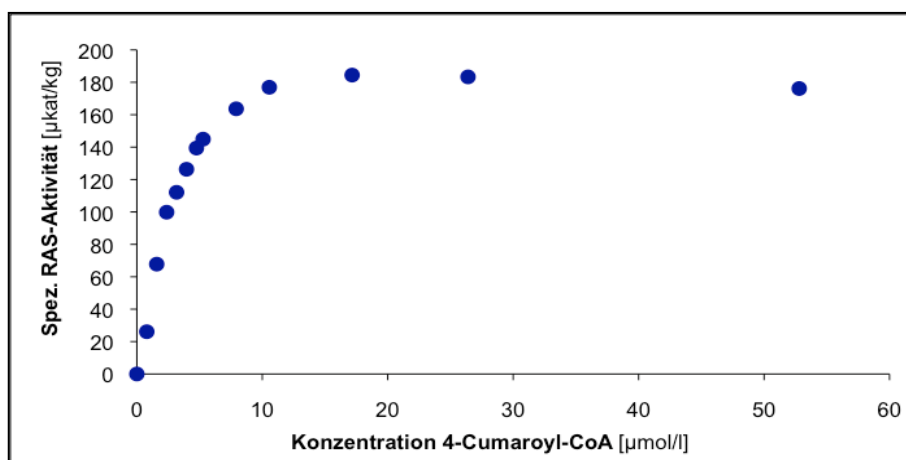


Abb. 94: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der 4-Cumaroyl-CoA-Konzentration des Testansatzes mit DHPL

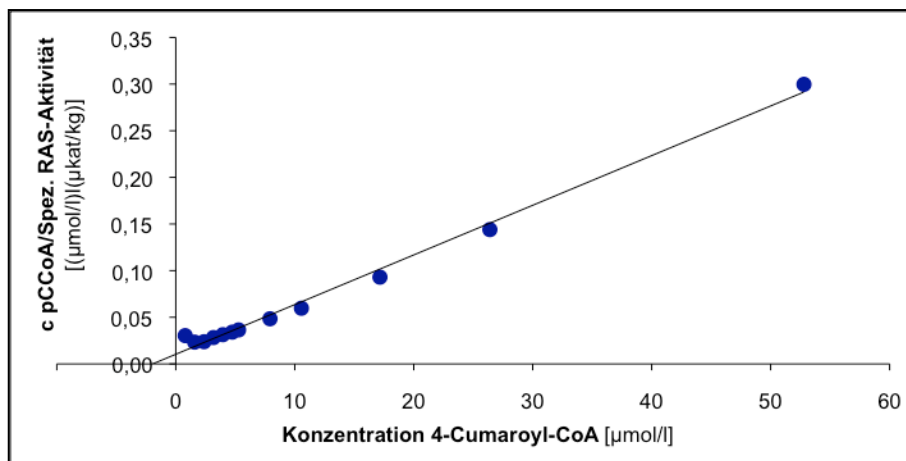


Abb. 94 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 94 nach Hanes-Woolf

Mit DHPL als Reaktionspartner (0,4 mmol/l/Reaktionsansatz) kann der apparente K_m -Wert für 4-Cumaroyl-CoA nach Hanes-Woolf mit 2 $\mu\text{mol/l}$ angegeben werden (Abb. 94 a). Bereits ab einer Konzentration von 12 $\mu\text{mol/l}$ ist eine Substratsättigung zu beobachten (Abb. 94).

In die Berechnung aller Werte gingen die Ergebnisse von 3 bzw. 4 Bestimmungen ein.

3.2.6.6 K_m -Werte für pHPL

Zur Bestimmung der apparenten K_m -Werte für pHPL musste die Reaktionszeit auf 30 Sekunden verkürzt werden. Die Reaktionsansätze wurden bei 30 °C für wenige Minuten vorgewärmt und schließlich inkubiert.

Mit Caffeoyl-CoA als aktiviertem Hydroxyzimtsäure-Ester (100 $\mu\text{mol/l}$ im Testansatz) wurde in einem Konzentrationsbereich von 16 bis 800 $\mu\text{mol/l}$ pHPL ein apparenter K_m -Wert von etwa 70 $\mu\text{mol/l}$ und eine Substratsättigungskonzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt (Abb. 95).

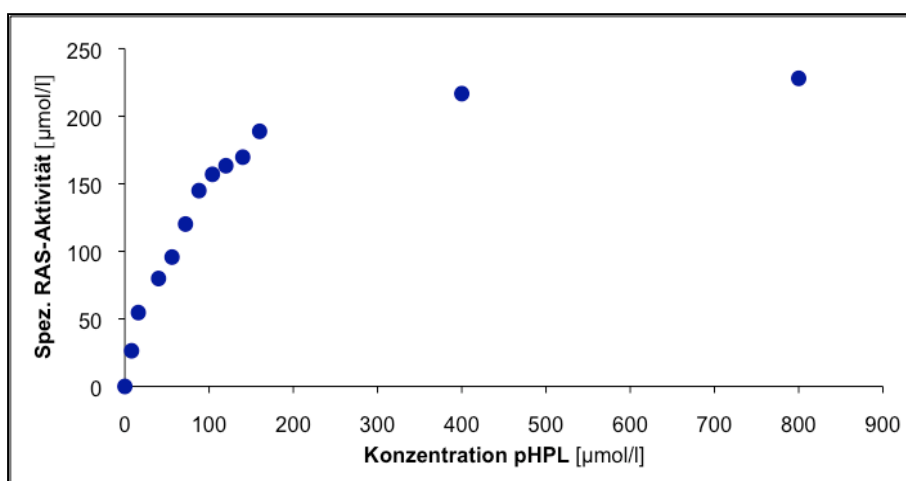


Abb. 95: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der pHPL-Konzentration im Testansatz mit Caffeoyl-CoA als zweitem Substrat

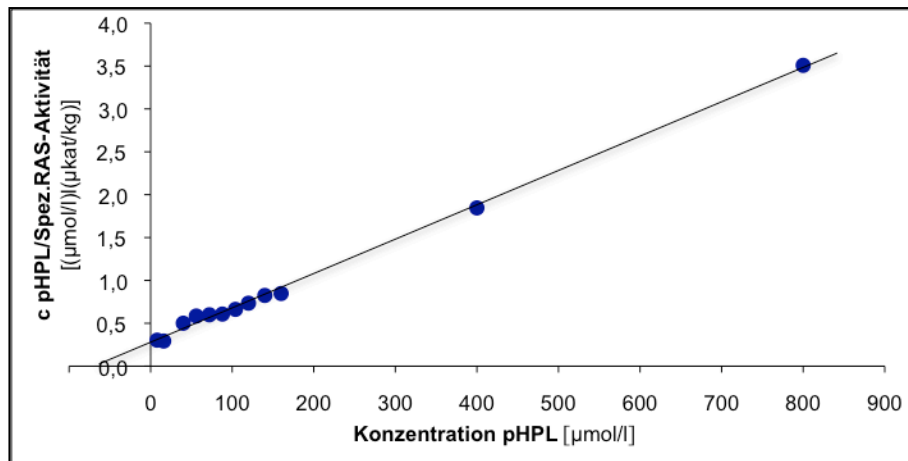


Abb. 95 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 95 nach Hanes-Woolf

Die Berechnung erfolgte nach der Methode von Hanes-Woolf unter Berücksichtigung von 5 Bestimmungen für jeden Messwert (Abb. 95 a).

Wird 4-Cumaroyl-CoA anstelle von Caffeoyle-CoA zum Testansatz gegeben, werden sehr viel niedrigere Werte erhalten. Substratsättigung wird bereits bei 40 µmol/l erreicht (Abb. 96) und der apparente K_m -Wert kann mit etwa 14 µmol/l angegeben werden. Die abgebildete Substratsättigungskurve bezieht sich, wie die Linearisierung der Daten nach Hanes-Woolf, auf den Ergebnisse von 5 Bestimmungen für jeden Messwert (Abb. 96 a).

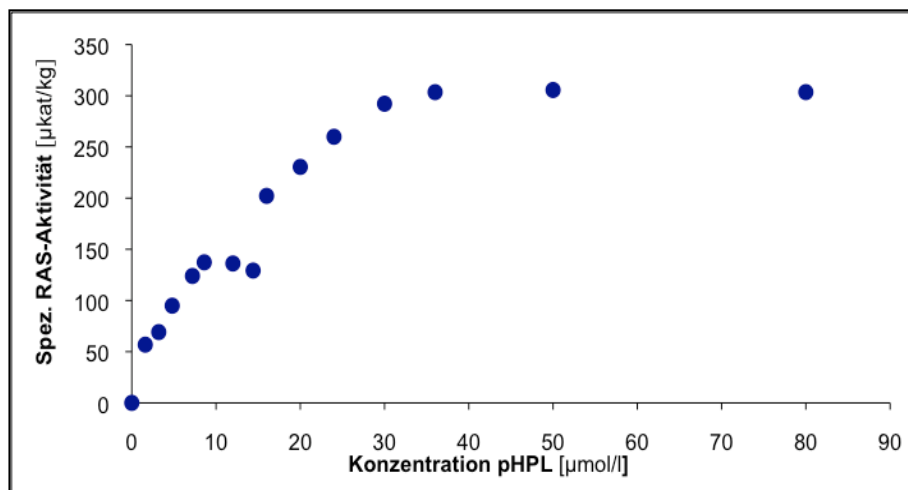


Abb. 96: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der pHPL-Konzentration im Testansatz mit 4-Cumaroyl-CoA aus zweitem Substrat

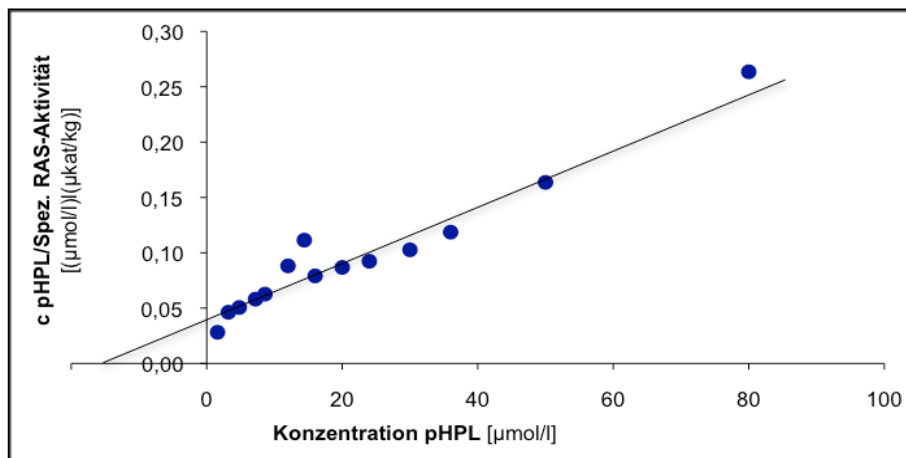


Abb. 96 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 96 nach Hanes-Woolf

2.3.6.7 K_m -Wert DHPL

R(+)-DHPL reagiert mit Caffeoyl-CoA zu Rosmarinsäure und mit 4-Cumaroyl-CoA zu 4-Cumaroyl-3',4'-Dihydroxyphenyllactat. Rosmarinsäure und rosmarinsäureartige Ester mit zwei Hydroxylgruppen im Hydroxyzimtsäure-Anteil können am besten bei 333 nm detektiert werden, diejenigen mit lediglich einer Hydroxylgruppe an Position 4 des aromatischen Rings, wie 4-Cumaroyl-DHPL und 4-Cumaroyl-pHPL, werden bei 312 nm erfasst.

Testansätze zur Ermittlung des apparenten K_m -Wertes für DHPL enthielten Caffeoyl-CoA oder 4-Cumaroyl-CoA in einer Konzentration von 30 μmol/l. Die besten Ergebnisse wurden bei 30 °C und einer kurzen Reaktionszeit von 30 Sekunden erhalten.

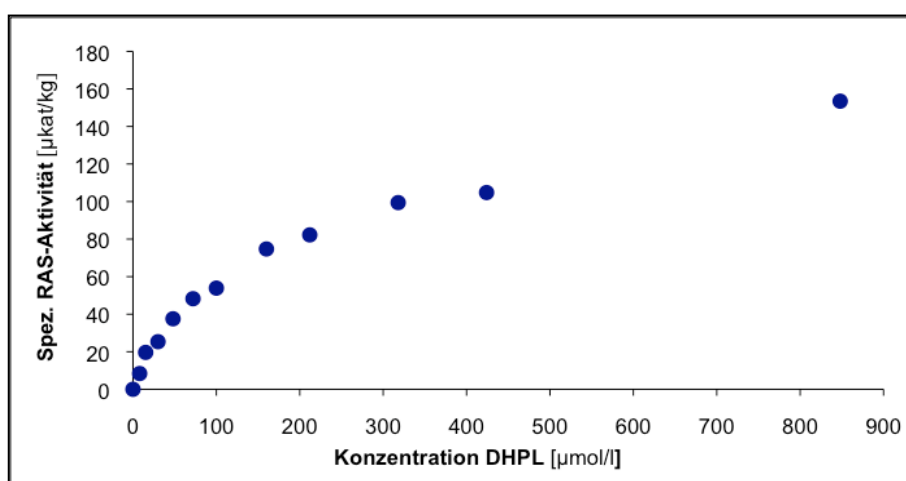


Abb. 97: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der DHPL-Konzentration im Reaktionsansatz mit Caffeoyl-CoA als zweitem Substrat

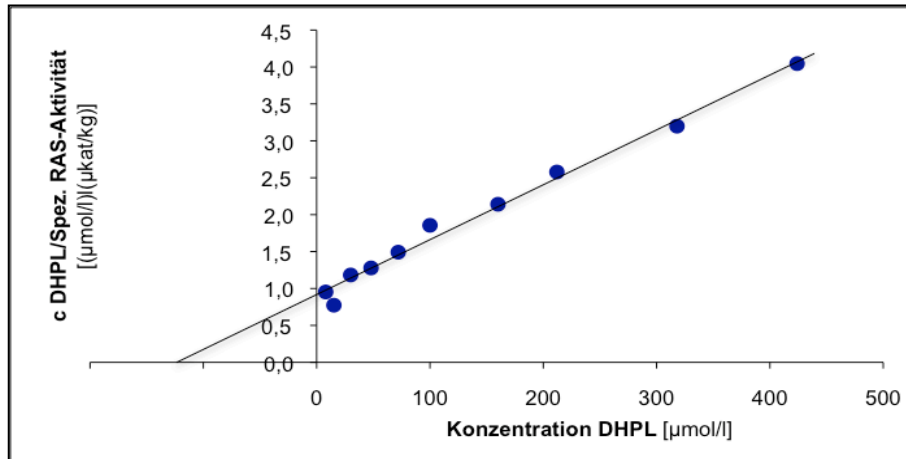


Abb. 97 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 97 nach Hanes-Woolf

Durch Mittelung von drei Messreihen konnte für DHPL mit Caffeoyl-CoA die in Abbildung 97 wiedergegebene Substratsättigungskurve erstellt werden. Durch Linearisierung der Daten nach Hanes-Woolf ergibt sich ein apparenter K_m -Wert für DHPL von etwa 120 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 97 a).

Die gleichen Werte werden auch erhalten, wenn 4-Cumaroyl-CoA anstelle von Caffeoyl-CoA im Reaktionsansatz enthalten ist. Die Sättigungskurve steigt wieder nur sehr flach an (Abb. 98). Da bei geringen DHPL-Konzentrationen stets nur eine lineare Zunahme der spezifischen Aktivität und keine exponentielle Aktivitätssteigerung beobachtet werden konnte, wurde zur Bestimmung der K_m -Werte die Methode nach Hanes-Woolf gewählt (Abb. 98 a). Nach dieser Kinetik üben die Messpunkte mit großen Substratkonzentrationen den größten Einfluss auf den Verlauf der Ausgleichsgerade aus.

Die Enzymaktivität wurde für jede DHPL-Konzentration viermal gemessen und schließlich gemittelt.

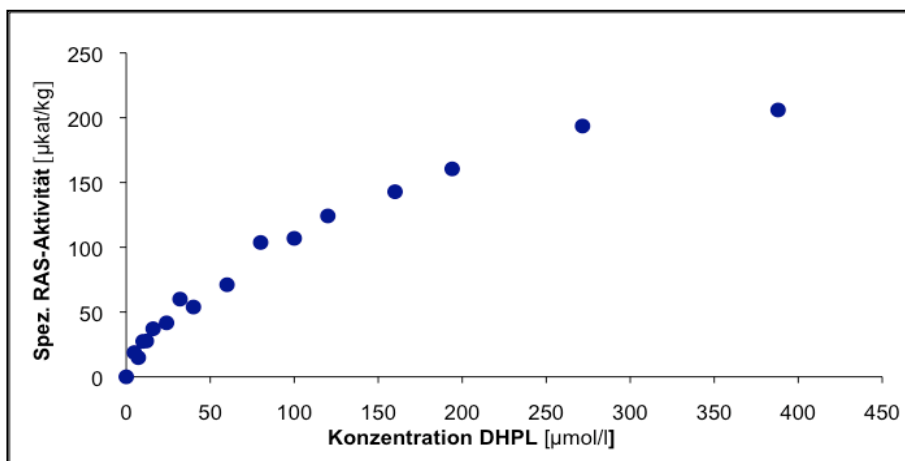


Abb. 98: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der DHPL-Konzentration im Testansatz mit 4-Cumaroyl-CoA als zweitem Substrat

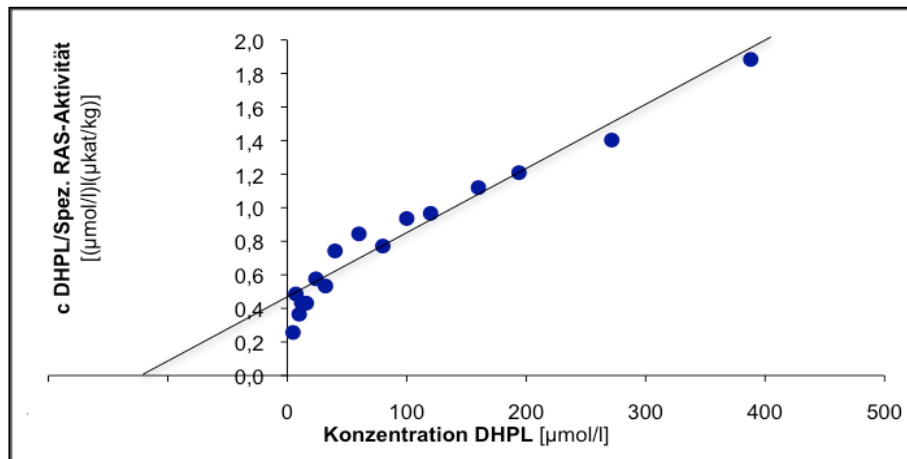


Abb. 98 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 98 nach Hanes-Woolf

3.3 Klonierung der Phenylalanin Ammoniak-Lyase

3.3.1 Klonierung der PAL-cDNA

Da die Enzymaktivität der PAL im Proteinrohextrakt sehr gering war und weder der K_m -Wert für L-Phenylalanin noch das pH-Optimum des Enzyms bestimmt werden konnten (Kap. 3.2.1.3), sollte die PAL der Melisse kloniert und nach heterologer Expression in *E. coli* charakterisiert werden.

Zu diesem Zweck wurden degenerierte Primer entwickelt, die auf konservierte Regionen bereits bekannter PAL-Sequenzen gerichtet waren (Primer CW-PALv und CW-PALh). Diese flankierten ein Stück von etwa 1450 Basen, das nach Vervielfältigung durch PCR im Vektor pGEM®-T sequenziert und als Teil einer PAL identifiziert werden konnte. Mithilfe dieser Sequenz sollte die cDNA-Volllänge der PAL aufgeklärt werden. Durch RACE-PCR konnten die 5'- und 3'-Enden identifiziert werden.

Da eine Expression des Gens im Vektor pET15b geplant war, wurden zur Vervielfältigung der Volllängensequenz Primer entwickelt, die gleichzeitig eine *Nde*I-Schnittstelle an 5'- und 3'-Ende der Sequenz einführten.

Nachdem in vielfältigen PCR-Amplifikationen keine Volllängensequenz erhalten wurde, wurden die 5'- und 3'-RACE-Sequenzen überprüft und der wirkliche 5'-Terminus gefunden. Dieser verhalf zur Amplifikation einer PAL-cDNA-Volllängensequenz (Abb. 99).

Da eine chinesische Arbeitsgruppe zwischenzeitlich eine PAL aus *Salvia miltiorrhiza* erfolgreich in einem pQE-Vektor (pQE30) kloniert hatte (Song und Wang, 2009), wurde auch zur Expression der PAL aus *Melissa officinalis* ein pQE-Vektor (pQE70) gewählt. Um die Sequenz in diesen Vektor ligieren zu können, mussten an 5'- und 3'-Ende Schnittstellen für *Bgl*II eingeführt werden. Nachdem sowohl durch Sequenzierung als auch durch

Restriktionsverdau die richtige Leserichtung des Inserts bestätigt worden war, wurde die PAL im *E. coli*-Stamm M15[pREP4] exprimiert (Kap. 2.5.5).

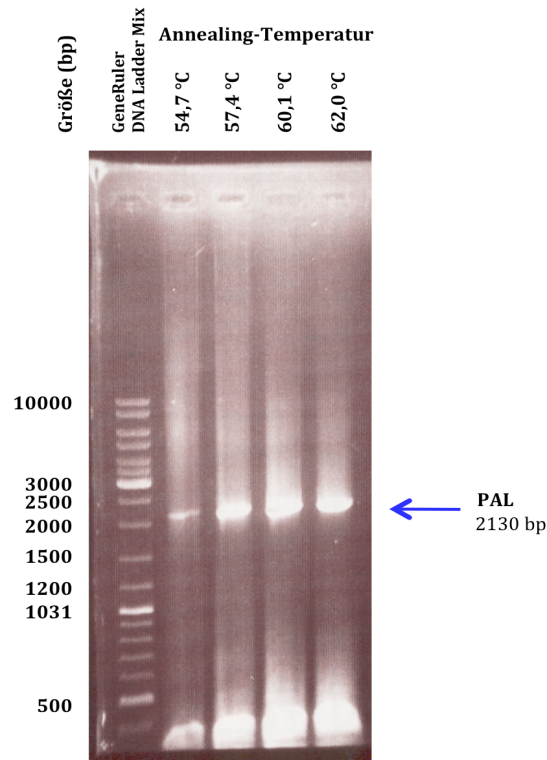


Abb. 99: Amplifikation der PAL cDNA-Volllänge

Die Sequenz der PAL konnte wie folgt ermittelt werden (Abb. 100):

```

atggcagagaacgggtcatcatgattccaacgggtttctgcgtgaagcagaatgatccgttg      60
M A E N G H H D S N G F C V K Q N D P L
aactgggtggcggcgccggagtcgctcaagggcagccaccttgatgaggtgaagcggatg      120
N W V A A A E S L K G S H L D E V K R M
gtggaggagttcaggaagccgggtggtgaagctcggcggagagaccctcacgatatctcag      180
V E E F R K P V V K L G G E T L T I S Q
gtagcggcgatcgccgccaaggataatgcggtggcgggtggagctggccgagtcggccagg      240
V A A I A A K D N A V A V E L A E S A R
gccggcgtcaaggccagcagcgattgggttatggagagcatgaacaaaggaactgacagt      300
A G V K A S S D W V M E S M N K G T D S
tacggcgtcaccaccggattcgggtgccacttcacaccgcaggactaagcagggcgcgct      360
Y G V T T G F G A T S H R R T K Q G G A
cttcagaaggagctcattaggttcttgaatgctggaattttcggaaatgggacagagact      420
L Q K E L I R F L N A G I F G N G T E T
aaccacacactgccgcacacggcaacaagagcggcaatgttggtgaggatcaacactctt      480
N H T L P H T A T R A A M L V R I N T L
ctgcaaggttactccggcatcagattcgaaatcttggaagccatcaccaaattcctcaac      540
L Q G Y S G I R F E I L E A I T K F L N
    
```

Ergebnisse

cagaacatcaccccatgcctccccctccgcggcaccatcacgcctccggcgatctggtg	600
Q N I T P C L P L R G T I T A S G D L V	
cccttatcctatatcgctggccttctcaccgggctcccaattccaaggccgtggggccc	660
P L S Y I A G L L T G R P N S K A V G P	
aacggagaacccctcacgcggaacaagccttcaagctcgccggcgatcaatggcggttc	720
N G E P L T A E Q A F K L A G V N G G F	
ttcgagctgcagcccaaggaagggtcgcgctcgtcaacggcaccgcagtcggctccgga	780
F E L Q P K E G L A L V N G T A V G S G	
ttggcctccatcgccctgttcgaggccaacatcctcgtgtgctgtcggaagtcatgtcc	840
L A S I A L F E A N I L A V L S E V M S	
gccatcttcgccaagtcatgaacggaaagcctgaattcacgcgatcattgacgcacaag	900
A I F A E V M N G K P E F T D H L T H K	
ctgaagcaccatcccggacagatcgaggccgctataatggaacacattctcgacggg	960
L K H H P G Q I E A A A I M E H I L D G	
agcggttatgttaaggctgcgcagaagttgcacgacatggatccccctgcagaagccgaag	1020
S G Y V K A A Q K L H D M D P L Q K P K	
caggacagatatgccctccgcacatcgccgcagtggtcggccctcagatcgaagtcac	1080
Q D R Y A L R T S P Q W L G P Q I E V I	
cgcaccgccaccaagatgatcgagagggaaatcaactccgtcaacgacaaccccttgatc	1140
R T A T K M I E R E I N S V N D N P L I	
gacgttgctagaagcaaggcaattcacggtggaacttccaaggcactcccatcgagtg	1200
D V A R S K A I H G G N F Q G T P I G V	
tccatggacaatgccagattggccatcgcatccatcggaagctcttggtcgtcaattc	1260
S M D N A R L A I A S I G K L L F A Q F	
tccgaactcgtcaacgacttctacaacaacggattgccatccaacctatccggcgccgg	1320
S E L V N D F Y N N G L P S N L S G G R	
aaccctagcctggactacggcttcaaggggtcggaatatcgccatggcttcctactgctcg	1380
N P S L D Y G F K G S E I A M A S Y C S	
gagctccagttcctggctaataccggtcaccaaccacgtgcagagcgcgagcagcataac	1440
E L Q F L A N P V T N H V Q S A E Q H N	
caggatgtgaactcattgggtttgatctcgtcgcgcaagacagtcgaggctctggacatc	1500
Q D V N S L G L I S S R K T V E A L D I	
ctcaaactcatgtcatccacctacttggttggttatgccaggccattgatttgaggcat	1560
L K L M S S T Y L V G L C Q A I D L R H	
ttggaggagaatctgaagcacgccgtgaagaacaccgtgagccaagttgctaaacgaact	1620
L E E N L K H A V K N T V S Q V A K R T	
ctaacaatgggcgccaatggagagctccatccttcagattctgcgagaaggacttgatc	1680
L T M G A N G E L H P S R F C E K D L I	
cgtgtggtcgaccgtgagtacgtcttcgcctacatcgacgatccctgcagcgccacctac	1740
R V V D R E Y V F A Y I D D P C S A T Y	
ccactgatgcagaagctgaggcaagtcctcgtcgcgacgcactcaagaacggcgaaggc	1800
P L M Q K L R Q V L V E H A L K N G E G	
gagaagaatgccagcacctccatcttcagaagatcgaagctttcgaggaagagctcaag	1860
E K N A S T S I F Q K I E A F E E E L K	
actctcttgccctaaggaagttgagagcgcgaggaccgctctcgagagtgggaatccagcg	1920
T L L P K E V E S A R T A L E S G N P A	
atcgccaaccggattgcggagtgaggtcgtaccggttgataagttcatcagagaggag	1980
I A N R I A E C R S Y P L Y K F I R E E	
ctcggcgcggaacttcttgacgggggagaaggtggtgctcgccgggagaggagtgcgacaag	2040
L G A D F L T G E K V V S P G E E C D K	
gtgttcacggcggttgagcaatggcctcattattgatccgttggttggaatgccttcaagga	2100
V F T A L S N G L I I D P L L E C L Q G	
tggaatggtgcacctctgcctatctgctag	2130
W N G A P L P I C -	

Abb. 100: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der PAL aus *Melissa officinalis*

3.3.2 Sequenzvergleich der PAL

Die vollständige cDNA-Sequenz der PAL aus *Melissa officinalis* besteht aus einem offenen Leserahmen von 2127 Nukleotiden und codiert entsprechend für 709 Aminosäurereste. Das errechnete Molekulargewicht der PAL beträgt 65,7 kDa. Der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,86.

Bei einer EMBL-Datenbanksuche nach ähnlichen Nukleotidsequenzen ergaben sich folgende Ähnlichkeiten mit anderen PAL. Die größten Ähnlichkeiten bestehen zu den folgenden drei Sequenzen (Stand August 2009):

87 % Identität	<i>Agastache rugosa</i> 2448 Basenpaare; mRNA	EMBL-Eintrag: AF326116
87 % Identität	<i>Salvia miltiorrhiza</i> 3784 Basenpaare; Gen-Sequenz	EMBL-Eintrag: EF462460
81 % Identität	<i>Digitalis lanata</i> 2403 Basenpaare; mRNA	EMBL-Eintrag: AJ002221

3.3.3 Phylogenetische Analyse der PAL

In Datenbanken konnte eine Vielzahl kompletter Sequenzen oder Teilsequenzen von Phenylalanin Ammoniak-Lyasen gefunden werden. Beispielhaft wurden 50 von diesen translatierten Aminosäuresequenzen von Vollängen-cDNA diverser zweikeimblättriger Pflanzen für phylogenetische Analysen ausgewählt. Da die PAL in den meisten Pflanzen in mehreren Isoformen auftritt, dürfte die Gesamtzahl bekannter PAL-cDNA-Vollängen die Auswahl deutlich übertreffen. Mithilfe des Programms MEGA (Kumar et al., 2008) konnte ein phylogenetischer Stammbaum erstellt werden (Abb. 101).

Bereits auf den ersten Blick ist die Gliederung des Stammbaumes in die Unterklassen der Rosidae und Asteridae möglich. Auch innerhalb dieser Unterklassen treten die PAL-Isoformen meist gruppiert nach Pflanzenfamilien auf.

Die PAL der Melisse wurde im Kladogramm den PAL anderer Lamiaceen (*Salvia miltiorrhiza* und *Agastache rugosa*) zugeordnet. In unmittelbarer Nähe befinden sich die PAL von *Digitalis lanata* (Plantaginaceae) und *Rehmannia glutinosa* (Gesneriaceae), die wie die Lippenblütler zu den Lamiales zählen.

Die Anordnung des Stammbaums darf jedoch nicht darüber hinweg täuschen, dass sich die Isoformen einzelner Arten wie jene von *Ricinus communis*, *Manihot esculenta* und *Vitis vinifera* durchaus auch phylogenetisch weiter voneinander differenziert haben und in unterschiedlichen Gruppen anzutreffen sind. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die systematische Anordnung dieses Stammbaums bei Berücksichtigung weiterer PAL-Isoformen möglicherweise nicht komplett aufrecht erhalten werden kann.

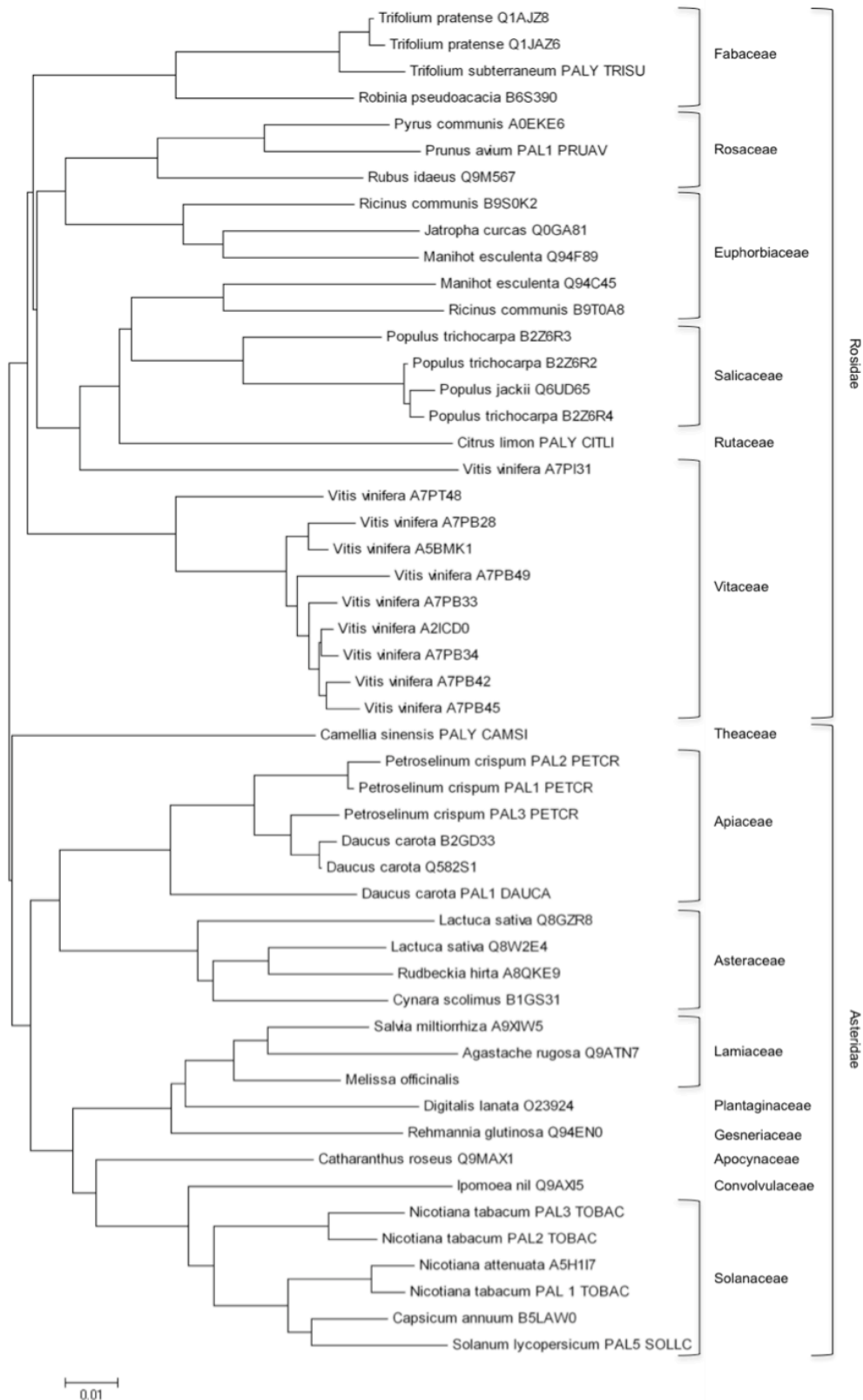


Abb. 101: Phylogenetischer Stammbaum der PAL. In den meisten Fällen entspricht die Bezeichnung der Proteinsequenz auch der Bezeichnung der Sequenz in der EMBL-Datenbank. Die übrigen Sequenzen können in der Datenbank unter folgenden Bezeichnungen gefunden werden: PALY TRISU = P45734; PAL1 PRUAV = O64963; PALY CITLI = Q42667; PALY CAMSI = P45726; PAL2 PETCR = P45728; PAL1 PETCR = P24481; PAL3 PETCR = P45729; PAL1 DAUCA = O23865; PAL3 TOBAC = P45733; PAL2 TOBAC = P35513; PAL1 TOBAC = P25827; PAL5 SOLLC = P26600

3.3.4 Reinigung der PAL durch Affinitätschromatographie

Durch Expression im Vektor pQE70 kann ein 6xHis-Tag, ein Aminosäure-Motiv aus 6 hintereinander liegenden Histidin-Molekülen, unmittelbar an den C-Terminus des heterolog exprimierten Proteins geknüpft werden, sofern die Translation der mRNA nicht frühzeitig durch ein Stoppcodon beendet wird. Dieser His-Tag® kann zur Reinigung des rekombinanten Proteins durch Metall-Chelat-Chromatographie genutzt werden (Kap. 2.5.6).

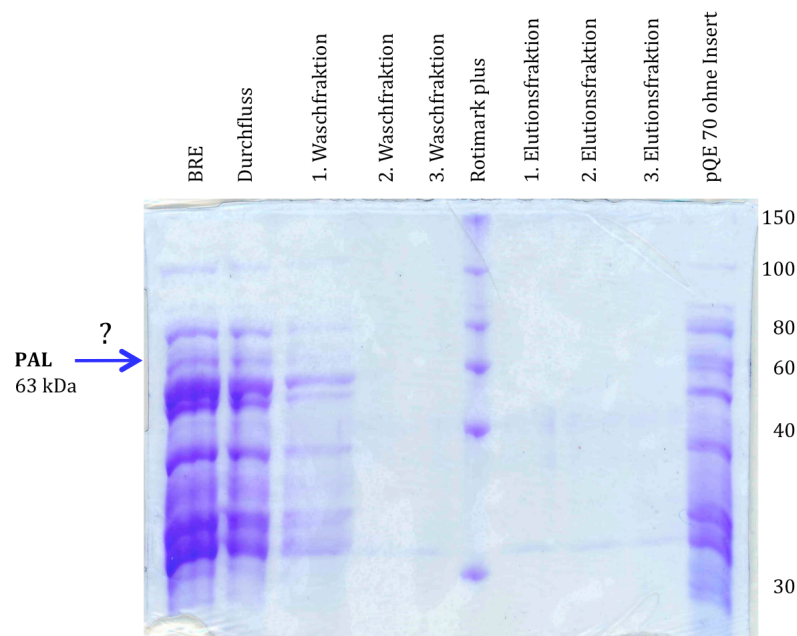


Abb. 102: SDS-PAGE der rekombinant exprimierten PAL;
BRE = Bakterienrohextrakt

Obgleich ein 6xHis-Tag an den C-Terminus der PAL addiert wurde, gelang die Reinigung der PAL durch Affinitätschromatographie nicht. Auch wenn die Gel-Matrix erst unmittelbar vor Zugabe des bakteriellen Proteinrohextraktes mit Nickel-Lösung regeneriert worden war, erfolgte keine Bindung des PAL-Enzyms an die Ni^{2+} -Ionen des Säulenmaterials. Auch die Inkubation unterschiedlicher Volumina Proteinrohextrakt blieb ohne das gewünschte Resultat. In jedem Fall konnte PAL-Aktivität nur im Durchfluss, aber niemals in den Wasch- und Elutionsfraktionen nachgewiesen werden.

Da die PAL nicht gereinigt werden konnte, kann ihre Expression auch nicht in Form einer SDS-PAGE dargestellt werden, da es nicht möglich war, eine der vielen Proteinbanden des Proteinrohextraktes oder des Durchflusses eindeutig der PAL zuzuordnen. Da keine gegen den His-Tag® gerichteten Antikörper zur Verfügung standen, konnte das Protein nicht durch Detektion dieses 6xHis-Tags im Western Blot identifiziert werden (Abb. 102).

3.3.5 Charakterisierung der heterolog exprimierten PAL

Die Charakterisierung der heterolog exprimierten PAL erfolgte aus dem bakteriellen Proteinrohextrakt (BRE). Die Gewinnung des BRE ist in Kapitel 2.5.4 beschrieben. Da bei einer Verlängerung der Kultivierungszeit der induzierten Bakterienkulturen auf 22 Stunden keine größere Enzymaktivität beobachtet werden konnte, wurden die Bakterienkulturen zur Charakterisierung des rekombinanten Enzyms stets 5 Stunden nach Induktion geerntet.

Weil Bakterienkulturen des *E. coli*-Stammes M15[pREP4], die den Expressionsvektor pQE70 ohne einligiertes Gen enthielten, in Enzymtests keine störende PAL-Aktivität zeigten, wurde auf eine Reinigung des Enzyms verzichtet.

3.3.5.1 Temperaturoptimum

Zur Ermittlung der Temperaturabhängigkeit der PAL wurde der HPLC-Test gewählt (Kap. 2.3.3.2), da dieser die Auswahl eines breiteren Testbereichs erlaubt. In einem Temperaturbereich zwischen 10 °C und 80 °C wurden jeweils Doppelproben angesetzt, die vor der Zugabe der Proteinlösung einige Minuten auf die gewünschte Temperatur vorgewärmt wurden. Jeder Reaktionsansatz enthielt 20 mmol/l L-Phenylalanin. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,03 mg/ml Protein gestartet.

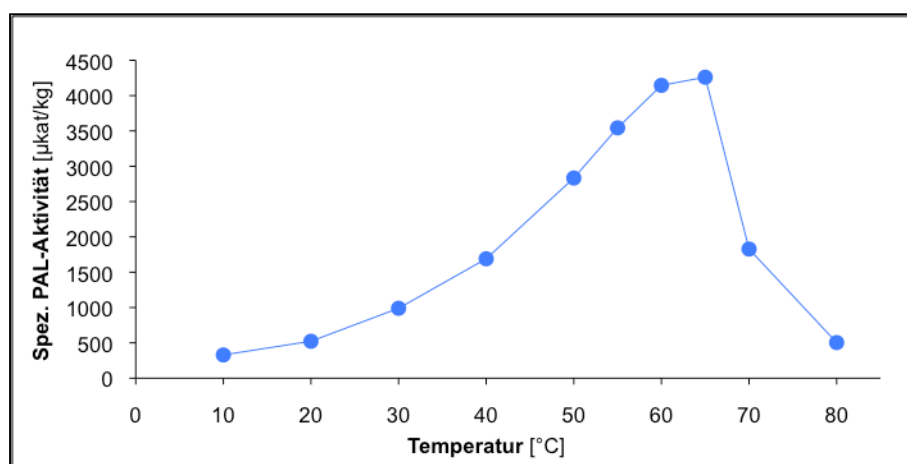


Abb. 103: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der PAL von der Inkubationstemperatur

Bei einer Reaktionszeit von 5 Minuten liegt die optimale Reaktionstemperatur der PAL bei 65 °C (Abb. 103). Das Ergebnis wurde durch 3 Messreihen bestätigt.

3.3.5.2 pH- und Pufferoptimum

Auch zur Bestimmung des pH- und Pufferoptimums wurde der HPLC-Test gewählt, da bereits zuvor beobachtet worden war, dass es, beispielsweise bei der Bestimmung des pH- und Pufferoptimums der 4CL (Kap. 3.2.3.3), im photometrischen Test bei verschie-

denen pH-Werten zur Trübung des Testansatzes und damit zur Beeinträchtigung der Auswertung kommen kann.

Das pH-Optimum der PAL wurde sowohl in Borsäure-Borax-Puffer als auch in 1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer in einem pH-Bereich von pH 7,0 respektive 5,5 bis pH 9,0 im Reaktionsansatz bestimmt. Alle Testansätze wurden 5 Minuten bei 36 °C inkubiert. Durch photometrische Tests war bereits bestätigt worden, dass bei der gewählten Proteinkonzentration von 0,03 mg/ml ein linearer Reaktionsablauf gewährleistet ist.

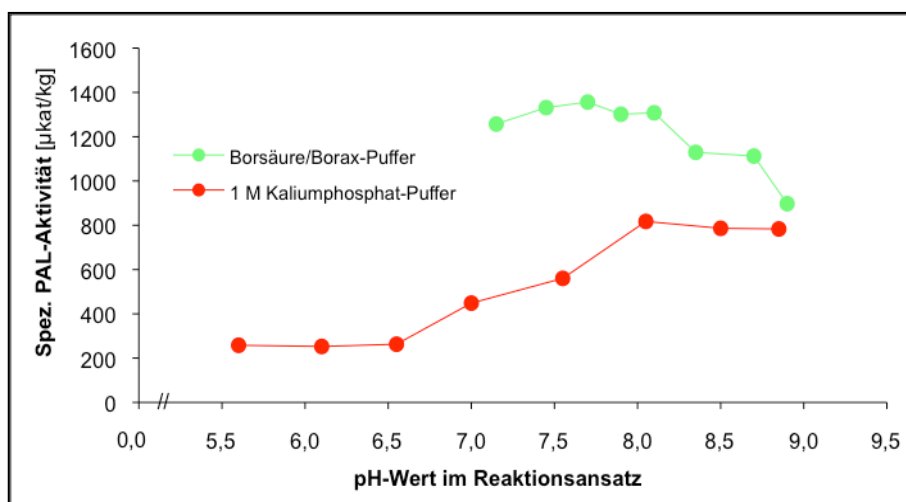


Abb. 104: Spezifische Aktivität der PAL in Abhängigkeit vom pH-Wert im Reaktionsansatz in Borsäure-Borax- und 1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer

Die höchsten PAL-Aktivitäten wurden in Borsäure-Borax-Puffer zwischen pH 7,0 und pH 8,0 (pH-Wert im Reaktionsansatz) gemessen. Die Aktivität in 1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer liegt deutlich niedriger. In letzterem Puffer konnte ein pH-Optimum um pH 8,0 in Reaktion bestimmt werden (Abb. 104).

In die Auswertung gingen 6 Messwerte für jeden Messpunkt ein.

3.3.5.3 K_m -Wert für L-Phenylalanin

Die Bestimmung des apparenten K_m -Wertes für L-Phenylalanin erfolgte durch photometrische Messung der Produktbildung bei 290 nm. Alle Proben wurden im vorgewärmten Küvettenhalter des Photometers bei 36 °C inkubiert. Insgesamt wurden 14 Messpunkte bestimmt. Für jeden Messpunkt wurden 6 Messungen vorgenommen.

Die Substratsättigungskurve zeigt Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 105). Bei einer L-Phenylalanin-Konzentration von etwa 300 $\mu\text{mol/l}$ wird Substratsättigung erreicht. Der apparente K_m -Wert kann nach Linearisierung nach der Methode von Lineweaver-Burk mit 47 $\mu\text{mol/l}$ angegeben werden (Abb. 105 a).

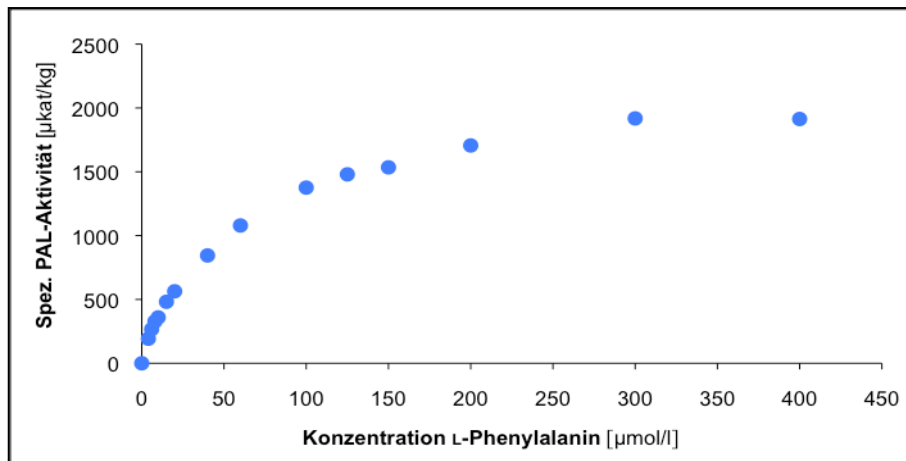


Abb. 105: Sättigungskurve der PAL für das Substrat L-Phenylalanin

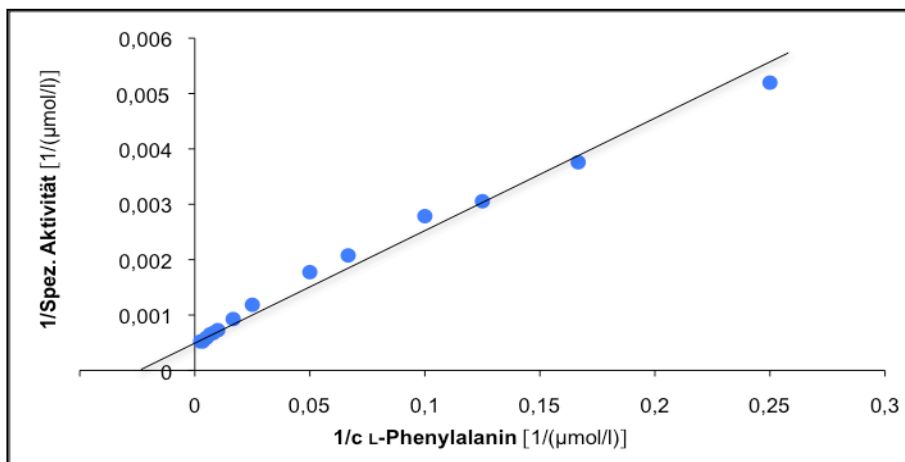


Abb. 105 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 105 nach Lineweaver-Burk

3.3.6 Aufklärung der genomischen Sequenz der PAL

In Kapitel 2.5.10 wird beschrieben, wie die genomische Sequenz der PAL mithilfe der Vollängenprimer Mo-PAL-5'VL und Mo-PAL-3'VL amplifiziert werden konnte. Nach Ligation und Vermehrung der Sequenz im Vektor pGEM®-T war es möglich, in mehreren Sequenzierschritten die Basenabfolge aufzuklären. Die genomische Sequenz der PAL ist 2966 Basenpaare lang und enthält ein Intron von 836 Basen Länge. Das Intron beginnt hinter der 380. Base, die Teil eines Triplets ist, welches Arginin codiert. Abbildung 106 zeigt die Sequenz der PAL mit eingeschobenem Intron.

```

atggcagagaacggtcatcatgattccaacggtttctgcgtgaagcagaatgatccgttg      60
M A E N G H H D S N G F C V K Q N D P L
aactgggtggcggcggcggagtcgctcaagggcagccaccttgatgaggtgaagcggatg      120
N W V A A A E S L K G S H L D E V K R M

```

Ergebnisse

gtggaggagttcaggaagccggtggtgaagctcggcggagagaccctcacgatatctcag	180
V E E F R K P V V K L G G E T L T I S Q	
gtagcggcgatcgccgccaaggataatgcggtggcgggtggagctggccgagtcggccagg	240
V A A I A A K D N A V A V E L A E S A R	
gccggcgtcaaggccagcagcgattgggttatggagagcatgaacaaaggaactgacagt	300
A G V K A S S D W V M E S M N K G T D S	
tacggcgtcaccaccggattcggtgccacttcacaccgcaggactaagcagggcggcgct	360
Y G V T T G F G A T S H R R T K Q G G A	
cttcagaaggagctcattaggtatacttctcttactatgtttatTTTTTTgaattcttaa	380/40
L Q K E L I R	
aaaaaaaaatctctgctgctgttaaatttcgtttttatatgagtttcctttcttagaatatg	100
catacaattttgcactgagtgatgaggtggtggtcagagtaaaattgtcttcacagttgt	160
gttggtagaaaattttgtgcacccaattaggttagaggtgaaatatgctttcttatcttttc	220
aagtcatactatttctgtagccttgagaagtgtaaatgactgcgatattatcttcatcttc	280
ttccgagaagcatttaatttttaagatgtactagctcttactTTTTTTTTTTTTTTTTgt	340
ttgtcaaagttacacaaatttttaaggctgcgtcacaggggactcgaacccgagacctt	400
tggcctcgggcattaaccccttaccactaggccaactcacacacacttgtagctctt	460
acttaagggtttggcaatgttaggttaagctcttaacgtgggtgcagtaaatgtacctctgg	520
ttttttaattttgttttatttcttttggggacgtgtacctagtgtattatcagtaataata	580
ttttatttactctattattcaaaaaatacataaatctaggctatccacctattcaggagtt	640
gaccgtagctaaatttcgggccattaaaaataaagaaatgaaaacgagtactaacagcc	700
tcaaataattgttatgcaaaagatttactagattcgtaggggtacacacatttttgggtggg	760
aatttttaaaattcagttagaagcatcaactcaatattaattggacaaaatttgatgaaa	820
ttgaaaattgcaacagggttcgttcttgaatgctggaatttttcggaaatgggacagagact	836/424
F L N A G I F G N G T E T	
aaccacacactgccgcacacggcaacaagagcggaatgttggtgaggatcaacactctt	484
N H T L P H T A T R A A M L V R I N T L	
ctgcaaggttactccggcatcagattcgaaatcttggaagccatcaccaaattcctcaac	544
L Q G Y S G I R F E I L E A I T K F L N	
cagaacatcaccccatgcctccccctccgcggcaccatcacgcctccggcgatctggtg	604
Q N I T P C L P L R G T I T A S G D L V	
cccttatcctatatcgctggccttctcacccggcgctcccaattccaaggccgtggggccc	664
P L S Y I A G L L T G R P N S K A V G P	
aacggagaacccctcacgcgaacaagccttcaagctcgccggcgatcaatggcggttc	724
N G E P L T A E Q A F K L A G V N G G F	
ttcgagctgcagcccaaggaagggtcgcgctcgtcaacggcaccgcagtcggctccgga	784
F E L Q P K E G L A L V N G T A V G S G	
ttggcctccatcgccctgttcgaggccaacatcctcgtgtgtgtcggaagtcagtcc	844
L A S I A L F E A N I L A V L S E V M S	
gccatcttcgccgaagtcattgaacggaagcctgaattcaccgatcacttgacgcacaag	904
A I F A E V M N G K P E F T D H L T H K	
ctgaagcaccatcccggaagatcgaggccgcccgtataatggaacacattctcgacggg	964
L K H H P G Q I E A A A I M E H I L D G	
agcggttatgttaaggctgcgcagaagttgcacgacatggatcccctgcagaagccgaag	1024
S G Y V K A A Q K L H D M D P L Q K P K	

caggacagatatgccctccgcacatcgccgcagtggtcggccctcagatcgaagtcac	1084
Q D R Y A L R T S P Q W L G P Q I E V I	
cgcaccgccaccaagatgatcgagagggaaatcaactccgtcaacgacaaccccttgatc	1144
R T A T K M I E R E I N S V N D N P L I	
gacgttgctagaagcaaggcaattcacgggtggaaacttccaaggcactcccatcggagtg	1204
D V A R S K A I H G G N F Q G T P I G V	
tccatggacaatgccagattggccatcgcatccatcggaagctcttggttcgctcaattc	1264
S M D N A R L A I A S I G K L L F A Q F	
tccgaactcgtcaacgacttctacaacaacggattgccatccaacctatccggcgggcgg	1324
S E L V N D F Y N N G L P S N L S G G R	
aaccctagcctggactacggcttcaaggggtcggaatcgccatggcttcctactgctcg	1384
N P S L D Y G F K G S E I A M A S Y C S	
gagctccagttcctggctaataccgggtcaccaaccacgtgcagagcgcgagcagcataac	1444
E L Q F L A N P V T N H V Q S A E Q H N	
caggatgtgaactcattgggtttgatctcgtcgcgcaagacagtcgaggctctggacatc	1504
Q D V N S L G L I S S R K T V E A L D I	
ctcaaactcatgtcatccacctaacttggttggttatgccaggccattgatttgaggcat	1564
L K L M S S T Y L V G L C Q A I D L R H	
ttggaggagaatctgaagcacgccgtgaagaacacccgtgagccaagttgctaaacgaact	1624
L E E N L K H A V K N T V S Q V A K R T	
ctaacaatgggcgccaatggagagctccatccttcagattctgcgagaaggacttgatc	1684
L T M G A N G E L H P S R F C E K D L I	
cgtgtggtcgaccgtgagtagctcttcgcctacatcgacgatccctgcagcgccacctac	1744
R V V D R E Y V F A Y I D D P C S A T Y	
ccactgatgcagaagctgaggcaagtcctcgtcgagcacgcactcaagaacggcggaaggc	1804
P L M Q K L R Q V L V E H A L K N G E G	
gagaagaatgccagcacctccatcttcagaagatcgaagctttcgaggaagagctcaag	1864
E K N A S T S I F Q K I E A F E E E L K	
actctcttgccctaaggaagttgagagcgcgaggaccgctctcgagagtgggaatccagcg	1924
T L L P K E V E S A R T A L E S G N P A	
atcgccaaccggattgctggagtgcaggtcgtagccgttgtagaagttcatcagagaggag	1984
I A N R I A E C R S Y P L Y K F I R E E	
ctcggcgcggaacttcttgacgggggagaaggtggtgctgccgggagaggagtgcgacaag	2044
L G A D F L T G E K V V S P G E E C D K	
gtgttcacggcggttgagcaatggcctcattattgatccgttggttggaatgccttcaagga	2104
V F T A L S N G L I I D P L L E C L Q G	
tggaatggtgcacctctgcctatctgctag	2134
W N G A P L P I C -	

Abb. 106: Genomische Sequenz der PAL mit eingeschobenem Intron (*kursiv*).

3.3.7 Southern Blot-Analyse zur Ermittlung der Zahl der PAL-Genkopien

Bereits beim Versuch, ein Teilstück der PAL mithilfe von RACE-PCR zur cDNA-Volllänge zu verlängern (Kap. 3.3.1), wurde das Auftreten zweier PAL-Allele vermutet. Eine dieser Isoformen konnte kloniert und nach Transformation in *E. coli* überexprimiert und charakterisiert werden. Die Klonierung des zweiten Allels war aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Um die Zahl der im Genom von *Melissa officinalis*-Suspensionskulturzellen auftretenden PAL-Genkopien nachzuweisen, wurde die Methode des Southern Blot gewählt (Kap. 2.6).

3.3.7.1 Herstellung einer DIG-markierten PAL-Sonde

Für die Southern-Blot-Analyse von PAL-Genkopien wurde eine DIG-markierte Sonde synthetisiert, die einer Sequenz von 1508 Basen im Mittelteil der Vollängen-cDNA entspricht. Obwohl das Intron im Bereich der Sonde liegt, ist seine Sequenz nicht Teil der Sonde, da zu deren Amplifikation cDNA als Template verwendet wurde.

Abbildung 107 zeigt die genomische Vollängensequenz der PAL. Nukleotide, die Teil der Sonde sind, sind hervorgehoben. Die Primer sind ebenfalls markiert. Darüber hinaus sind die Schnittstellen jener Enzyme farblich eingezeichnet, die zum Restriktionsverdau der genomischen DNA ausgewählt worden waren (Kap. 2.6.2).

ATGGCAGAGAACGGTCATCATGATTCCAACGGTTTCTGCGTGAAGCAGAATGATCCGTTGA
ACTGGGTGGCGGCGGCGGAGTCGCTCAAGGGCAGCCACCTTGATGAGGTGAAGCGGATGGT
GGAGGAGTTCAGGAAGCCGGTGGTGAAGCTCGGCGGAGAGACCCTCACGATATCTCAGGTA
GCGGCGATCGCCGCCAAGGATAATGCGGTGGCGGTGGAGCTGGCCGAGTCGGCCAGGGCCG
GCGTCAAGGCCAGCAGCGATTGGGTTATGGAGAGCATGAACAAAGGAACTGACAGTTACGG

Primer PALv

CGTCACCACCGGATTTCGGTGCCACTTCACACCGCAGGACTAAGCAGGGCGGCGCTCTTCAG
AAGGAGCTCATTAGGTATACTTCTCTTACTATGTTTATTTTTTTGAATTCTTAAAAAAAAA

EcoRI

AATCTCTGCTGCTGTAAATTTTCGTTTTATATGAGTTTCCTTTCTTAGAATATGCATACAAT
TTTGCAGTGAAGTATGAGGTGGTGGTCAGAGTAAATTTGTCTTCACAGTTGTGTTGGTAGA
AATTTTGTGCACCCAATTAGGTAGAGGTGAAATATGCTTTCTTATCTTTTCAAGTCATACT
ATTCTGTAGCCTTGAGAAGTGTAATGACTGCGATATTATCTTCATCTTCTTCCGAGAAGC
ATTTAATTTTAAAGATGTACTAGCTCTTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTGTCAAAGTTA
CACAAATTTTAAAGGCTGCGTCACAGGGGACTCGAACCCGAGACCTTTGGCCTCGGGCAT

DraI

TAACCCCTTACCCTAGGCCAACTCACACACACTTGTACTAGCTCTTACTTAAGGTTTGGC
AATGTTAGGTAAGCTCTTAACGTGGGTGCAGTAAATGTACCTCTGGTTTTTTAATTTTGT
TTATTTCTTTTGGGGACGTGTACCTAGTGATTATCAGTAATAATATTTTATTTACTCTATT
ATTCAAAAATACATAAATCTAGGCTATCCACCTATTCAGGAGTTGACCGTTAGCTAAATTT
CCGGCCATTAAAAATAAAGAAATGAAAACGAGTACTAACAGCCTCAAATAATTGTTATGCA
AAAGATTTACTAGATTTCGTAGGGTACACACATTTTTTGGTGGGAATTTTAAATTCAGTTA

DraI

GAAGCATCAACTCAATATTAATTGGACAAAATTTGATGAAATTGAAAATTGCAACAGGTTTC
TTGAATGCTGGAATTTTCGGAAATGGGACAGAGACTAACCACACACTGCCGCACACGGCAA
CAAGAGCGGCAATGTTGGTGAGGATCAACACTCTTCTGCAAGGTTACTCCGGCATCAGATT
CGAAATCTTGGAAGCCATCACCAAATTCCTCAACCAGAACATCACCCCATGCCTCCCCCTC
CGCGGCACCATCACCGCCTCCGGCGATCTGGTGCCCTTATCCTATATCGCTGGCCTTCTCA

SacII

CCGGGCGTCCCAATTCCAAGGCCGTGGGGCCCAACGGAGAACCCCTCACCGCCGAACAAGC
CTTCAAGCTCGCCGGCGTCAATGGCGGCTTCTTCGAGCTGCAGCCCAAGGAAGGGCTCGCG
CTCGTCAACGGCACCGCAGTCGGCTCCGGATTGGCCTCCATCGCCCTGTTTCGAGGCCAACA
TCCTCGCTGTGCTGTCGGAAGTCATGTCCGCCATCTTCGCCGAAGTCATGAACGGAAAGCC

TGAATTCACCGATCACTTGACGCACAAGCTGAAGCACCATCCCGGACAGATCGAGGCCGCC
EcoRI
 GCTATAATGGAACACATTCTCGACGGGAGCGGTTATGTTAAGGCTGCGCAGAAGTTGCACG
ACATGGATCCCCTGCAGAAGCCGAAGCAGGACAGATATGCCCTCCGCACATCGCCGCAGTG
BamHI
 GCTCGGCCCTCAGATCGAAGTCATCCGCACCGCCACCAAGATGATCGAGAGGGAAATCAAC
 TCCGTCAACGACAACCCCTTGATCGACGTTGCTAGAAGCAAGGCAATTCACGGTGGAACCT
 TCCAAGGCACTCCCATCGGAGTGTCCATGGACAATGCCAGATTGGCCATCGCATCCATCGG
NcoI
 GAAGCTCTTGTTGCTCAATTCTCCGAACCTCGTCAACGACTTCTACAACAACGGATTGCCA
 TCCAACCTATCCGGCGGCCGGAACCCTAGCCTGGACTACGGCTTCAAGGGTTCGGAAATCG
CCATGGCTTCCTACTGCTCGGAGCTCCAGTTCCTGGCTAATCCGGTCACCAACCACGTGCA
NcoI
 GAGCGCGGAGCAGCATAACCAGGATGTGAACTCATTGGGTTTGATCTCGTCGCGCAAGACA
 GTCGAGGCTCTGGACATCCTCAAACCTCATGTCATCCACCTACTTGGTTGGCTTATGCCAGG
 CCATTGATTTGAGGCATTTGGAGGAGAATCTGAAGCACGCCGTGAAGAACACCGTGAGCCA
 AGTTGCTAAACGAACTCTAACAATGGGCGCCAATGGAGAGCTCCATCCTTCCAGATTCTGC
 GAGAAGGACTTGATCCGTGTGGTCGACCGTGAGTACGTCTTCGCCTACATCGACGATCCCT
 GCAGCGCCACCTACCCACTGATGCAGAAGCTGAGGCAAGTCCTCGTCGAGCACGCACTCAA
 Primer PALh
 GAACGGCGAAGGCGAGAAGAATGCCAGCACCTCCATCTTCCAGAAGATCGAAGCTTTTCGAG
 GAAGAGCTCAAGACTCTCTTGCCCTAAGGAAGTTGAGAGCGCGAGGACCGCTCTCGAGAGTG
 GGAATCCAGCGATCGCCAACCGGATTGCGGAGTGCAGGTCGTACCCGTTGTACAAGTTCAT
 CAGAGAGGAGCTCGGCGCGGACTTCTTGACGGGGGAGAAGGTGGTGTGCGCGGGAGAGGAG
 TGCGACAAGGTGTTACGGCGTTGAGCAATGGCCTCATTATTGATCCGTTGTTGGAATGCC
 TTCAAGGATGGAATGGTGCACCTCTGCCTATCTGCTAG

Abb. 107: Genomische Volllängensequenz der PAL. Nukleotide, die Teil der DIG-markierten Sonde sind, sind hervorgehoben, die Schnittstellen der Restriktionsenzyme farbig markiert.

Weitere Enzyme, die zum Restriktionsverdau verwendet wurden, waren *BclI*, *BglII*, *EcoRV*, *HindIII*, *NdeI*, *SpeI* und *XhoI*. Sie alle schneiden nicht im Bereich des Gens. Aus der Zahl der Banden in ihrer Spur kann direkt auf die Zahl der PAL-Genkopien im Genom der Melisse geschlossen werden. *BamHI* und *SacII* schneiden je einmal im Bereich der Sonde. Daher wird jede Genkopie theoretisch durch zwei Banden dargestellt. *EcoRI*, *DraI* und *NcoI* teilen die Sequenz in drei Teilstücke, da sie zweimal im Bereich der Sonde schneiden. Ob dies in zwei oder drei nachweisbaren Banden je Genkopie resultiert, hängt auch von der Länge der einzelnen Teilstücke ab. Damit die Sonde binden kann, müssen diese Teilstücke über eine ausreichende Länge verfügen. Geringfügige Abweichungen der Nukleotidsequenzen der Isoformen können dazu führen, dass einzelne Schnittstellen ausfallen oder weitere Schnittstellen auftreten. Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

3.3.7.2 Ergebnis des Southern Blot

In Abbildung 108 ist das Ergebnis des Southern Blot dargestellt. Deutlich erkennbar sind die beiden Banden in den Spuren von *Bgl*II und *Nde*I sowie die vier (oder fünf) Banden in der *Dra*I-Spur. Dies deutet daraufhin, dass mit der ausgewählten Sonde zwei Genkopien identifiziert werden konnten.

Die Ergebnisse der Restriktionsverdaue mit den übrigen Enzymen waren trotz wiederholter Durchführung auch unter Änderungen der Reaktionsbedingungen nicht aussagekräftig.

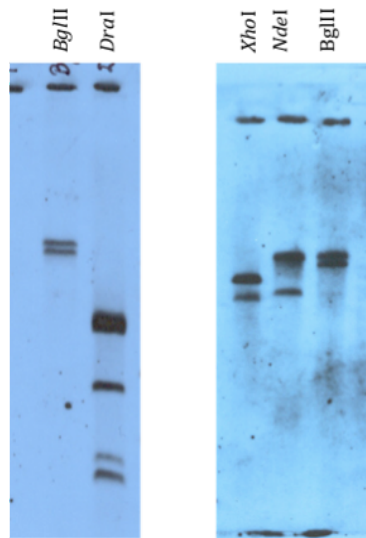


Abb. 108: Ergebnis des Southern Blot mit DIG-markierter PAL-Sonde

3.4 Klonierung einer cDNA für eine 4-Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase

Der Versuch, die 4CL im Proteinrohextrakt aus Melissen-Suspensionskulturen zu charakterisieren, war gescheitert, weil einerseits mit typischen Substraten wie 4-Cumarsäure keine Produktbildung beobachtet werden konnte und andererseits auch ohne das Cosubstrat ATP eine Enzymaktivität messbar war (Kap. 3.2.3). Diese Beobachtungen verleiteten zu der Vermutung, dass im Rohextrakt weitere Enzyme vorhanden sein könnten, die eine Produktbildung vortäuschen (vgl. Kap. 3.2.3.6) oder die entstandenen Produkte unmittelbar abbauen (vgl. Kap. 3.2.3.5). Auch der im Proteinrohextrakt ermittelte apparente K_m -Werte für Kaffeesäure (390 $\mu\text{mol/l}$) erscheint, verglichen mit dem Wert, der im Proteinrohextrakt aus *Coleus blumei* bestimmt wurde (5 $\mu\text{mol/l}$) (Petersen et al., 1994), verhältnismäßig hoch. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass mehrere Isoformen des Enzyms mit unterschiedlichen kinetischen Parametern nebeneinander

im Rohextrakt vorliegen und die Charakterisierung beeinflussen. Eine konkrete Erklärung der Beobachtungen kann jedoch nicht gegeben werden.

Die Klonierung der 4CL-cDNA und ihre Expression in Bakterien sollen eine vollständige Charakterisierung des Enzyms ermöglichen.

3.4.1 Klonierung der vollständigen 4CL-cDNA

Durch degenerierte Primer, die auf hochkonservierte Regionen der Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase aus verschiedenen Pflanzen gerichtet sind, wurde mit Melissen-cDNA ein Abschnitt von 685 Basen amplifiziert, der durch Sequenzierung als Teil einer 4CL identifiziert werden konnte. Auf Basis dieses Abschnitts war es möglich, die cDNA-Volllänge durch 5'- und 3'-RACE-PCR zu vervollständigen (Kap. 2.4.6).

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der hier identifizierten 4CL aus *Melissa officinalis* lautet (Abb. 109):

```

atggagaacccggcaggccaagaagagatcatattccgatccaagctccccgacatctat      60
M E N P A G Q E E I I F R S K L P D I Y
attccaaagcacctccccttacactcgtattgtttcgaaaacatttcgaaattcagcacg    120
I P K H L P L H S Y C F E N I S K F S T
cggccgtgcttgataaacggggcgacaggcgacgtgtacacgtacgaggaggtcgagctg    180
R P C L I N G A T G D V Y T Y E E V E L
accgcgcggaaagtcgcaacggggccttagccagctcggcatccaacaaggcgagacgatc    240
T A R K V A T G L S Q L G I Q Q G E T I
atgctcttgctcccaaactcccccgagtacgttttcgctttctaggcgcgctcatacata    300
M L L L P N S P E Y V F A F L G A S Y I
ggtgcagtcctccactatggcaaattcccttttttgcccctgccgaggtaatcaagcaagcc    360
G A V S T M A N P F F A P A E V I K Q A
aaggcctccgcccgaagctcatcatcacccaagcatgctacgtcgacaagggtgggagat    420
K A S A A A K L I I T Q A C Y V D K V G D
tacgcctccgacaacggagtggaaggttatgtgcatcgacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcg    480
Y A S D N G V K V M C I D A P P P G C L
ccgttctcggagctgacgtcggccgacgagcgcgacatgccggcggtgaagatacacccg    540
P F S E L T S A D E R D M P A V K I H P
gaggacgcggtggcgctgccgtactcttcgggacgacggggctgcccagggtgctgatg    600
E D A V A L P Y S S G T T G L P K G V M
ctcacgcacaaggggctggtgacgagtggtggcgacgaggtcgacggagagaatccgaac    660
L T H K G L V T S V A Q Q V D G E N P N
ctgtacattcatagcgaggatgtcatgtgtgctgtgctgccccttatttcacataactcg    720
L Y I H S E D V M L C V L P L F H I Y S
ctcaactccgttttgctgtgctgggttgctgggtgcggggcgatcttgatcatgcagaaa    780
L N S V L L C G L R V G A A I L I M Q K
ttcgacatcgttccgttttttgagctgatgcagaagtacaaagtgaccatcgggccccttc    840
F D I V P F L E L M Q K Y K V T I G P F
gtgccgtcgatagttctggccatcgccaagagtcggttggtgggtaaatatgacatttca    900
V P S I V L A I A K S P L V G K Y D I S
tctgtgcggatggcgatgtccggcgcgccgctaggaaggagctggaggattctgtg      960
S V R M A M S G A A P L G K E L E D S V
aggactaagtttcccaatgcaaaacttgacagggttatgggatgactgaagcaggggcca    1020
R T K F P N A K L G Q G Y G M T E A G P
gtgttatcaatgtgcctagcgttttgaaaagagccatttcgagataaaatcaggagcatgt    1080
V L S M C L A F A K E P F E I K S G A C

```

ggaactgttgtaagaaatgctgaagtgaaaattgttgatcctgaaactggtgcttctcta	1140
G T V V R N A E V K I V D P E T G A S L	
gggcgtaatcaatccggagagatttgcattagaggggaccagattatgaaaggttatctg	1200
G R N Q S G E I C I R G D Q I M K G Y L	
aacgatctggagtcaacaaagaggaccatagaccatgacggatggctgcacacgggcgac	1260
N D L E S T K R T I D H D G W L H T G D	
ataggattcattgatgctgacgacgagctcttcacgctcgatcgattgaaggaaataatc	1320
I G F I D A D D E L F I V D R L K E I I	
aaatacaaagggttccaagttgcgccagctgaaatcgaagccctcctccttagtcatcca	1380
K Y K G F Q V A P A E I E A L L L S H P	
tacatctccgacgctgcagttgtctcaatgcaagatgagcaagctggagaagtccctggt	1440
Y I S D A A V V S M Q D E Q A G E V P V	
gcttttgttgatgagatcgaatggttccaccattactgaggatgaaatcaagcaattcatc	1500
A F V V R S N G S T I T E D E I K Q F I	
tcgaaacaggttggttttctacaagcgaataaatcgtgtatttttcattgatgcaattccc	1560
S K Q V V F Y K R I N R V F F I D A I P	
aagtctccatcagggaaaatattgagaaaggatttgagatcaagattagcagctgcagtc	1620
K S P S G K I L R K D L R S R L A A A V	
taa	1623
-	

Abb. 109: Vollständige Nukleotid- und Aminosäuresequenz einer 4CL aus *Melissa officinalis*

Die klonierte 4CL aus *Melissa officinalis* ist ein Protein aus 540 Aminosäuren, die durch 1620 Basen codiert werden. Das errechnete Molekulargewicht liegt bei 58,1 kDa und der isoelektrische Punkt konnte bei pH 5,45 berechnet werden.

3.4.2 Expression und Reinigung der 4CL durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Nachdem die Expression der 4CL im Vektor pET15b fehlschlug, wurde der offene Lese-rahmen der cDNA in den Vektor pRSET C ligiert. Mit Hilfe dieses Plasmids konnten bereits eine 4CL aus *Salvia miltiorrhiza* (Zhao et al., 2006) und eine 4CL aus *Polygonum* (Rohde, unveröffentlicht) überexprimiert werden. Zur Produktion des Proteins dienten *E. coli* des Stammes BL21(DE3)pLysS, die in LB-Medium mit Ampicillin angezogen wurden (Kap. 2.5.4). Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden nach Induktion mit IPTG wurde die Bakterienkultur geerntet und, wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben, zur Gewinnung des Proteins aufgeschlossen.

Wie alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Plasmide bietet auch pRSET C die Möglichkeit, durch Genfusion einen His-Tag®, ein Aminosäuremotiv aus 6 hintereinander liegenden Histidin-Molekülen, an das Protein zu addieren. Im Falle des pRSET C befindet sich der 6xHis-Tag nach der Produktion des Proteins nicht unmittelbar an dessen N- oder C-Terminus, wie es bei den pQE-Vektoren der Fall ist, sondern im Abstand von 26 Aminosäureresten vor diesem. Daher erhöht sich das Molekulargewicht des überexprimierten Proteins auf 62,4 kDa.

Um die überexprimierte 4CL durch Affinitätschromatographie zu reinigen, musste der Imidazolgehalt des in Kapitel 2.5.6 beschriebenen Waschpuffers verringert werden.

Enthielt der Waschpuffer Imidazol in einer Konzentration von mehr als 15 mmol/l wurde das Protein bereits beim Waschen von der Matrix eluiert.

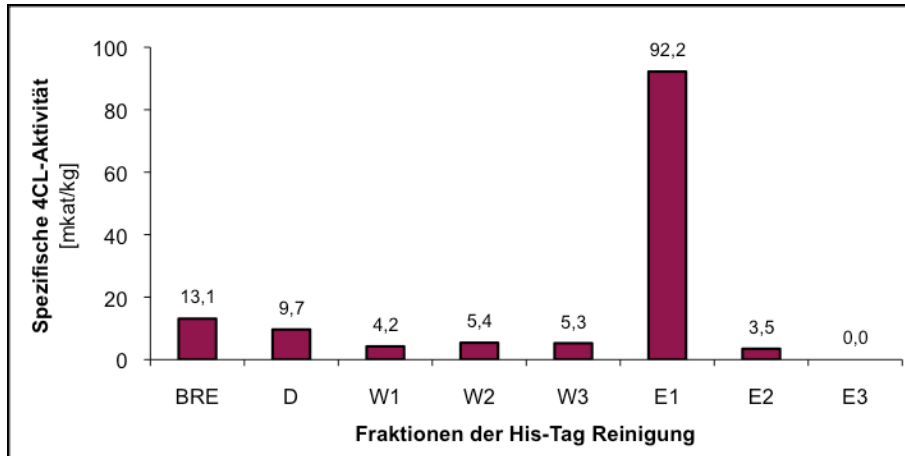


Abb. 110: Spezifische Aktivität der 4CL in den Fraktionen der His-Tag®-Reinigung: Proteinrohextrakt (BRE), Durchfluss (D), Waschfraktionen (W1, W2, W3) und Elutionsfraktionen (E1, E2, E3)

Abbildung 110 zeigt, dass die gereinigte 4CL in der ersten Elutionsfraktion enthalten ist. Die spezifischen Aktivitäten wurden mittels eines Standardenzymtests mit 4-Cumarsäure als Substrat bestimmt (Kap. 2.3.5).

Die Reinheit der Fraktionen kann durch eine SDS-PAGE (Kap. 2.5.7) überprüft werden. Zudem kann das überexprimierte Protein durch SDS-PAGE optisch sichtbar gemacht werden

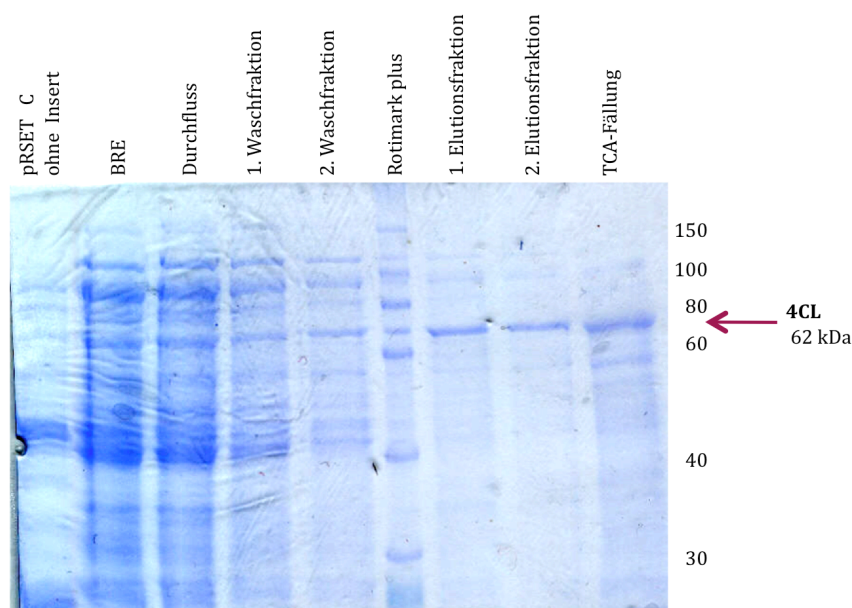


Abb. 111: Gel der SDS-PAGE: Die rekombinant exprimierte 4CL ist als Bande von ungefähr 62 kDa in allen Spuren außer der Kontrollspur mit leerem Vektor zu erkennen.

Zudem kann das überexprimierte Protein durch SDS-PAGE optisch sichtbar gemacht werden. Damit ein Protein bei der SDS-PAGE deutlich auf dem Gel erkannt werden kann, sind jedoch ausreichende Proteinkonzentrationen nötig. Aus diesem Grund wurde die 4CL zunächst durch TCA-Fällung (Kap. 2.5.8) aufkonzentriert.

Auf dem Gel der SDS-PAGE ist die 4CL eindeutig als Bande von ungefähr 62 kDa erkennbar (Abb. 111).

3.4.3 Phylogenetische Analyse der 4CL

Aus Datenbanken konnte durch vergleichende Suche mit der nun bekannten 4CL-Sequenz der Melisse eine Vielzahl weiterer 4CL-cDNA-Volllängensequenzen ermittelt werden. Von den abgeleiteten Proteinsequenzen wurden 40 ausgewählt, um mithilfe des Programmes MEGA (Kumar et al., 2008) einen phylogenetischen Stammbaum zu erstellen. Dieser soll eine Übersicht über die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der 4CL bieten, wenn die Auswahl der Proteinsequenzen auch lediglich exemplarisch und bei weitem nicht vollständig ist. Das Kladogramm ist in Abbildung 112 dargestellt.

Obwohl das Kladogramm auf den ersten Blick den Eindruck erweckt, es liege eine klare phylogenetische Unterteilung in Rosidae und Asteridae vor, wird auf den zweiten Blick deutlich, dass dies so nicht der Fall ist. Phylogenetisch weit entfernt zu den 4CL der übrigen Pflanzen findet sich in diesem Stammbaum eine kleine Gruppe von Rosidae, die sich aus zwei Isoformen der 4CL aus *Ruta* und einer 4CL aus *Arabidopsis* zusammensetzt. Auch die übrigen, zur Erstellung des Kladogramms ausgewählten 4CL der Rosidae wurden teilweise in weit entfernte Gruppen eingeordnet.

Die Salicaceae verdeutlichen, dass sich auch Isoformen der gleichen Art, beispielsweise solche aus *Populus jackii* oder *Populus trichocarpa*, durchaus phylogenetisch weit voneinander entfernt haben können.

Die 4CL-Isoform der Melisse ist eng mit den bekannten 4CL anderer Lippenblütler verwandt. In einer Gruppe mit den Lamiaceen findet sich auch eine 4CL aus *Paulownia fortunei*, dem Blauglockenbaum, der ebenfalls zur Ordnung der Lamiales zählt.

Innerhalb der Asteridae scheinen die Verwandtschaftsverhältnisse enger zu sein als innerhalb der Rosidae. Da die Auswahl der Proteinsequenzen jedoch willkürlich und nicht systematisch erfolgte, ist keine allgemeine Aussage möglich. Darüber hinaus befindet sich unter den 4CL der Asteridae auch eine Isoform aus *Vanilla planifolia*, die zu den Monokotyledonen zählt und daher als phylogenetisch weiter entfernt gelten kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bereits diese Auswahl von 4CL die Divergenz des Enzyms auf molekularer Ebene widerspiegelt.

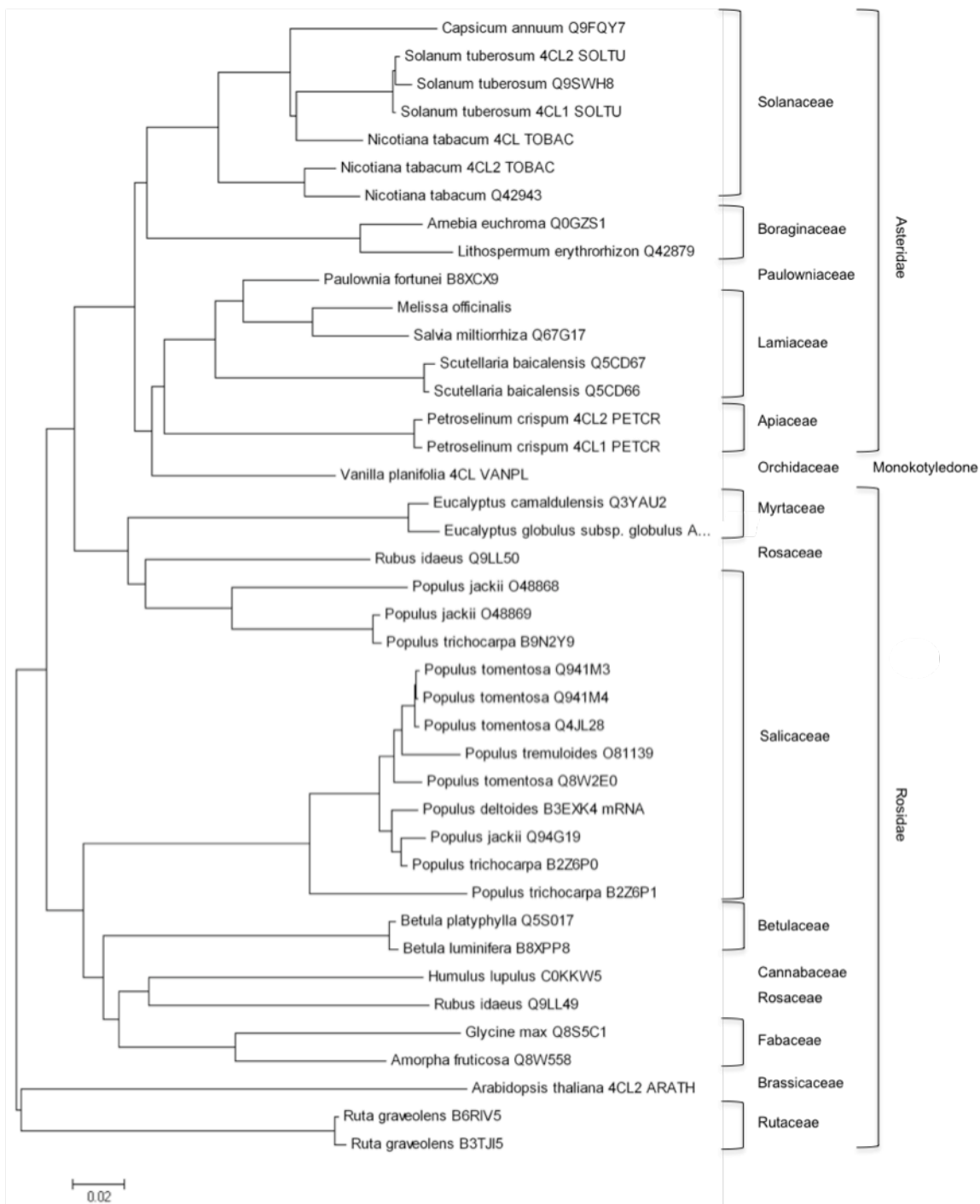


Abb. 112: Kladogramm aus 40 4CL-Sequenzen. In den meisten Fällen entspricht die Bezeichnung der Proteinsequenzen im Kladogramm bereits der Bezeichnung der entsprechenden Sequenzen in der EMBL-Datenbank. Die übrigen Sequenzen sind in der Datenbank unter folgenden Bezeichnungen zu finden: 4CL1 SOLTU = P31684; 4CL TOBAC = O24145; PAL2 TOBAC = O24146; 4CL2 PETCR = P14913; 4CL1 PETCR = P14912; 4CL VANPL = O24540; *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* = A8R7L9;

3.4.4 Charakterisierung der heterolog exprimierten 4CL

4CL-Enzymaktivitäten werden durch photometrische Messung der Absorptionzunahme des Testansatzes durch Bildung der CoA-Ester bestimmt (Kap. 2.3.5). Alle Werte

wurden mit dem bakteriellen Proteinrohextrakt ermittelt. Eine Aufreinigung durch Affinitätschromatographie war zwar möglich (Kap. 3.4.2), zur Bestimmung der Enzymcharakteristika jedoch nicht nötig, da Kontrollen, die den Expressionsvektor ohne das Gen enthielten, weder 4CL- noch 4CL-ähnliche Aktivität zeigten.

3.4.4.1 Substratspezifität

Das rekombinante Enzym setzte sowohl 4-Cumar- als auch Kaffeesäure zum entsprechenden Hydroxycinnamoyl-CoA-Ester um. Aufgrund des niedrigeren apparenten K_m -Wertes (siehe 3.4.4.5 und 3.4.4.6) kann Kaffeesäure als das bevorzugte Substrat angesehen werden. *t*-Zimtsäure wird praktisch nicht umgesetzt.

Zur Bestimmung der Enzymcharakteristika pH- und Pufferoptimum sowie Temperaturoptimum der rekombinanten 4CL wurde 4-Cumarsäure als Substrat gewählt.

3.4.4.2 Ermittlung der optimalen Proteinkonzentration

Die optimale Proteinkonzentration wurde bei einer Substratkonzentration von 0,5 mmol/l bestimmt. In einem Konzentrationsbereich von 0,028 bis 0,280 mg/ml Protein im Testansatz konnte bei einer Inkubationstemperatur von 40 °C über den gesamten Testbereich ein Anstieg der Enzymaktivität beobachtet werden. Ein linearer Verlauf ist bis zu einer Konzentration von etwa 0,056 mg/ml zu beobachten (Abb. 113).

Da die Steigung der Extinktionskurve (ΔE) in allen Tests im linearen Bereich zu Beginn der Reaktion bestimmt wurde, wird gleichzeitig bei alle Messungen ein linearer Reaktionsverlauf gewährleistet.

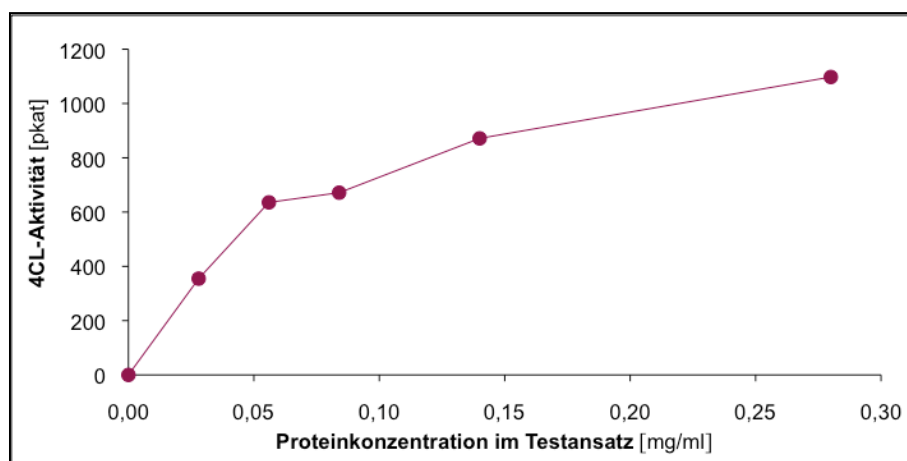


Abb. 113: Aktivität der 4CL in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im Testansatz

3.4.4.3 Temperaturoptimum

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde der Küvettenhalter des Photometers durch ein externes Wasserbad temperiert. Die Küvetten wurden vor Zugabe des Enzyms und dem Starten der Reaktion durch Coenzym A-Lösung im Küvettenhalter auf Temperaturen zwischen 21 °C und 52 °C im Reaktionsansatz vorgewärmt.

Die optimale Reaktionstemperatur der 4CL liegt bei etwa 40 °C (Abb. 114). Sie wurde durch Messung von 5 Doppelproben ermittelt.

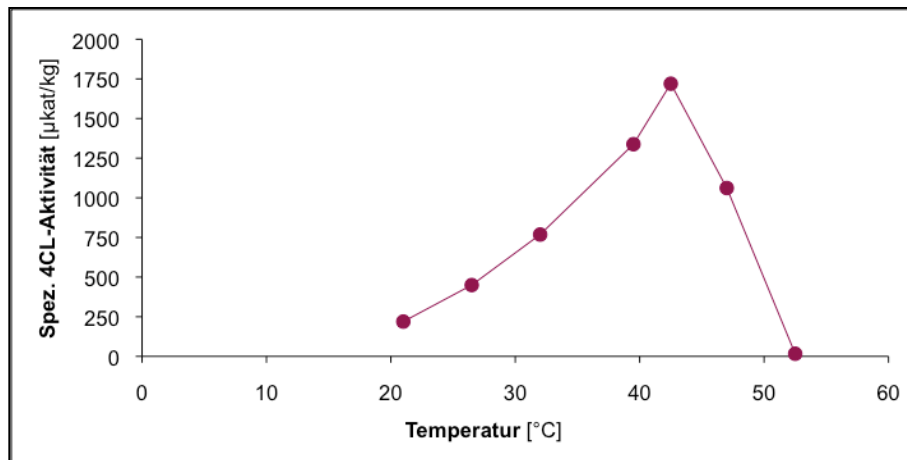


Abb. 114: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der 4CL von der Inkubationstemperatur

3.4.4.4 pH- und Pufferoptimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums standen folgende Puffer zur Verfügung: 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (pH 6,3 bis 8,5 im Reaktionsansatz) und 0,5 M Tris/HCl-Puffer (pH 6,8 bis 8,8 im Reaktionsansatz). Inkubiert wurde bei einer Temperatur von 40 °C. In 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer wurde die höchste Enzymaktivität bei pH 7,4 erreicht. Dieser pH-Wert wird in einem Testansatz mit $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 7,5 gemessen. In 0,5 M Tris/HCl-Puffer kann nur in einem schmalen pH-Bereich um 7,0 überhaupt eine Enzymaktivität beobachtet werden. Unter den übrigen Testbedingungen war nur eine sehr geringe Produktbildung messbar (Abb. 115). Diese Beobachtung wurde ebenfalls von Rohde für eine 4CL aus *Polygonum* bestätigt (mündliche Mitteilung).

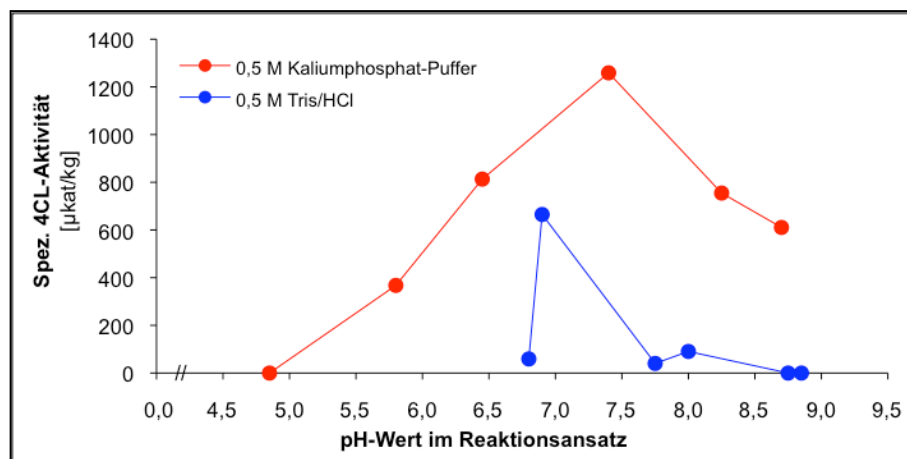


Abb. 115: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der 4CL vom pH-Wert des Reaktionsansatzes in 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer und 0,5 M Tris/HCl-Puffer

3.4.4.5 K_m -Wert für 4-Cumarsäure

In einem Konzentrationsbereich von 5 bis 350 $\mu\text{mol/l}$ 4-Cumarsäure konnte ein apparenter K_m -Wert von 8 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt werden. Die Sättigungskurve zeigt einen steilen Anstieg der 4CL-Aktivität und Substratsättigung bei etwa 50 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 116). Der apparenter K_m -Wert wurde durch Linearisierung der Daten nach der Methode von Hanes-Woolf bestimmt (Abb. 116 a). In die Berechnung gingen 8 Messwerte für jeden bestimmten Messpunkt ein.

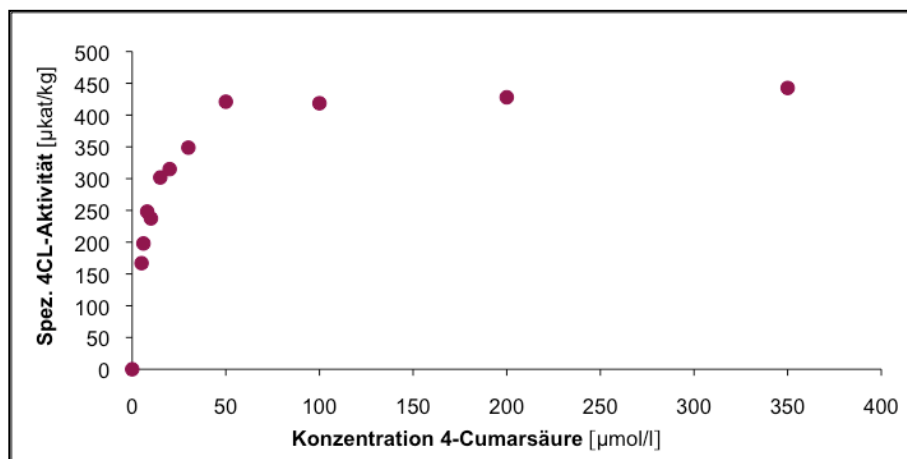


Abb. 116: Sättigungskurve der 4CL für das Substrat 4-Cumarsäure

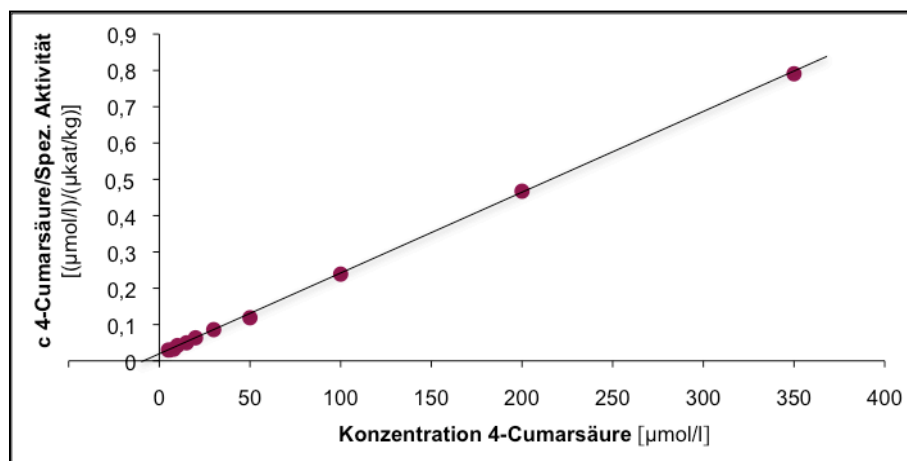


Abb. 116 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 116 nach Hanes-Woolf

3.4.4.6 K_m -Wert für Kaffeesäure

Der apparenter K_m -Wert für Kaffeesäure ist 7 $\mu\text{mol/l}$. Dieser Wert wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 5 und 200 $\mu\text{mol/l}$ Kaffeesäure im Reaktionsansatz bestimmt. Aus der Substratsättigungskurve für Kaffeesäure ist zu erkennen, dass die Sättigungskonzentration bei 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wird (Abb. 117).

Die abgebildeten Kurven resultieren aus der Mittelung von 5 Messreihen. Die Berechnung des K_m -Wertes erfolgte nach Linearisierung der Daten nach der Methode von Hanes-Woolf (Abb. 117 a).

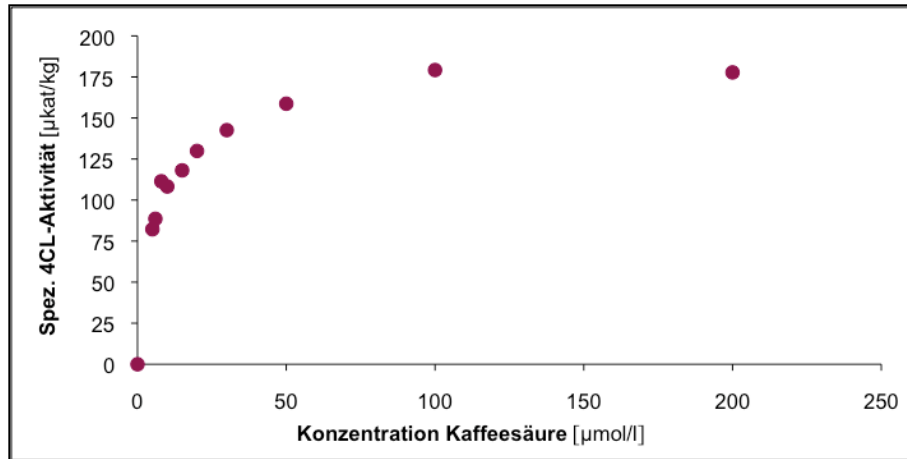


Abb. 117: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der 4CL von der Kaffeesäure-Konzentration im Reaktionsansatz

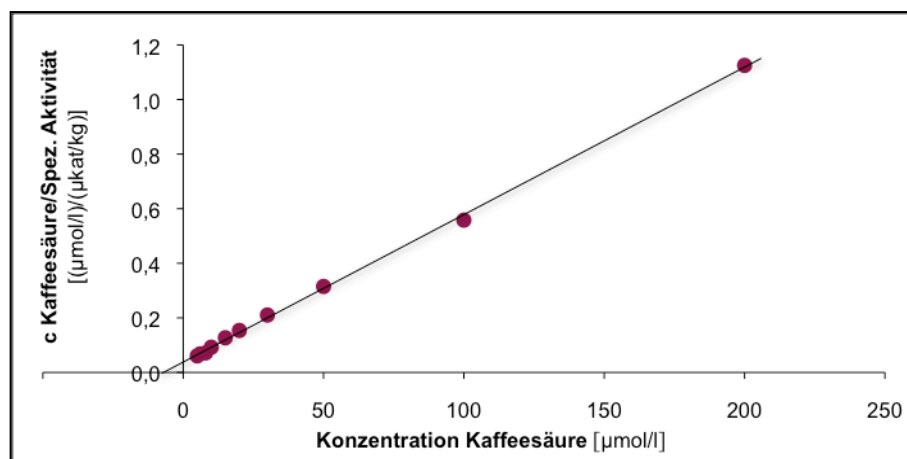


Abb. 117 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 117 nach Hanes-Woolf

3.4.4.7 K_m -Werte für ATP

Apparente K_m -Werte für ATP wurden sowohl mit dem Substrat 4-Cumarsäure als auch mit Kaffeesäure bestimmt. Die Hydroxyzimtsäure-Derivate waren im Testansatz in einer Konzentration von 0,5 mmol/l enthalten.

Für das Substrat 4-Cumarsäure konnten in einem Konzentrationsbereich von 12,5 µmol/l bis 2,5 mmol/l ATP im Testansatz ein apparenter K_m -Wert von 200 µmol/l und eine Substratsättigungskonzentration von 500 µmol/l bestimmt werden (Abb. 118). Die Bestimmung des K_m -Wertes erfolgte nach Linearisierung der Daten nach Hanes-Woolf (Abb. 118 a).

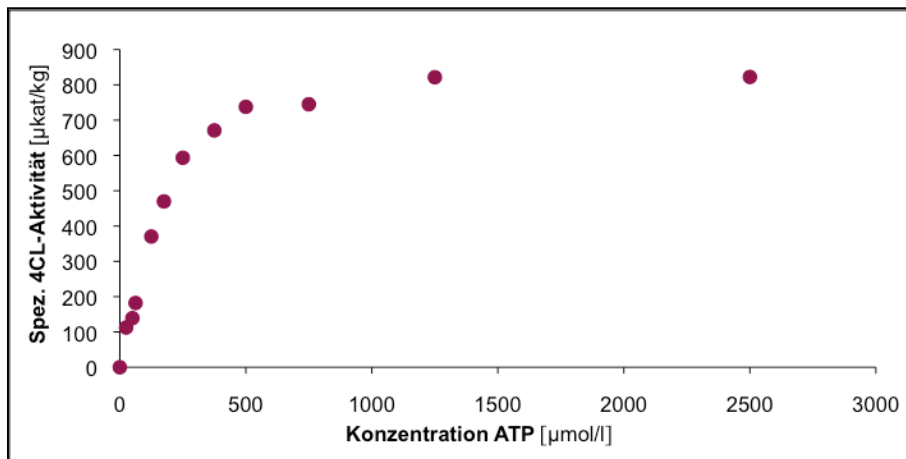


Abb. 118: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der 4CL von der ATP-Konzentration im Testansatz mit 4-Cumarsäure als Substrat

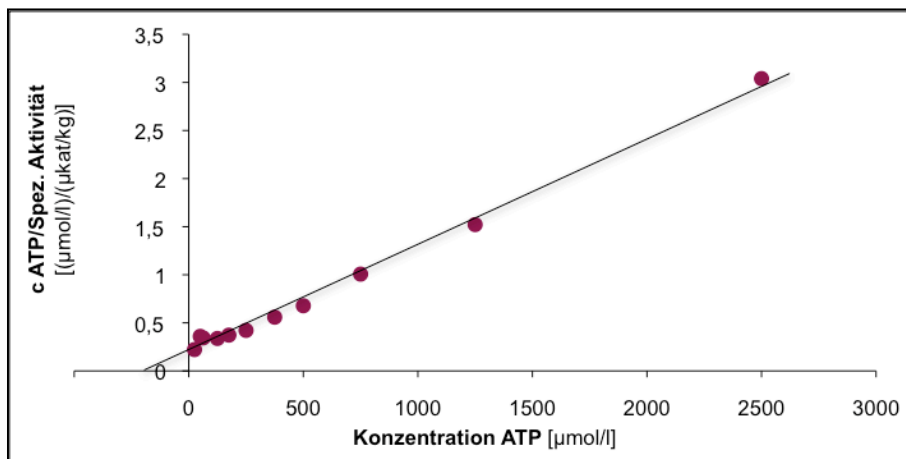


Abb. 118 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 118 nach Hanes-Woolf

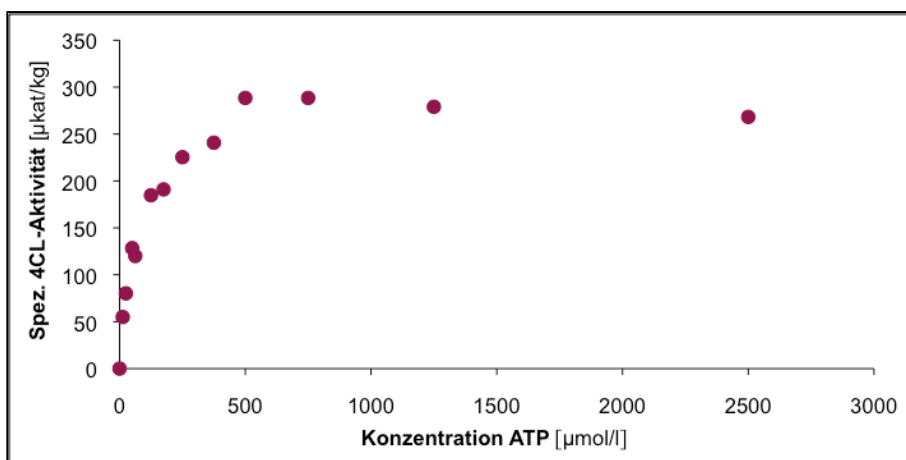


Abb. 119: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der 4CL von der ATP-Konzentration im Testansatz mit Substrat Kaffeesäure

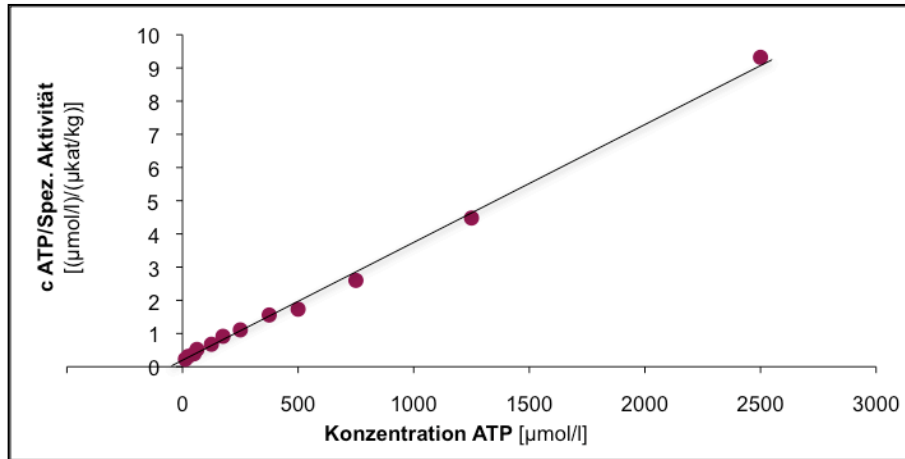


Abb. 119 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 119 nach Hanes-Woolf

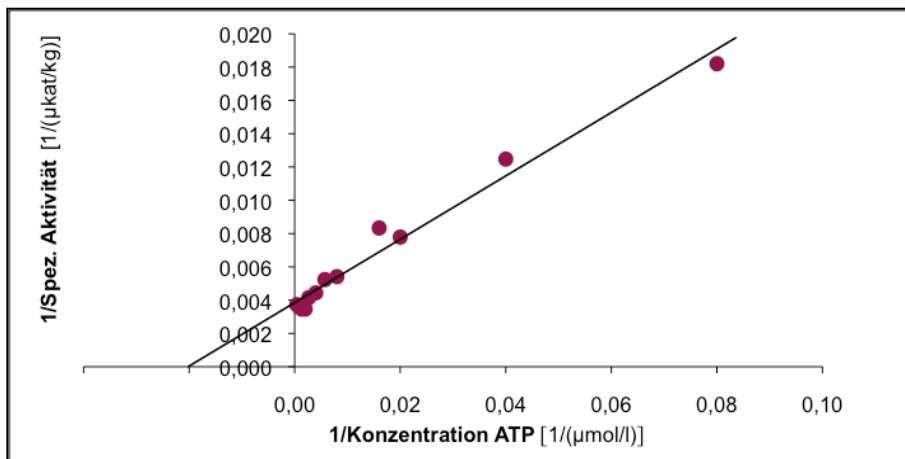


Abb. 119 b: Linearisierung der Daten aus Abb. 119 nach Lineweaver-Burk

Wird anstelle von 4-Cumarsäure Kaffeesäure zum Reaktionsansatz gegeben, wird die Sättigungskonzentration für ATP ebenfalls bei einer Konzentration von 500 μmol/l erreicht (Abb. 119), der apparente K_m -Wert errechnet sich jedoch sowohl nach der Methode von Lineweaver-Burk wie auch nach der Methode von Hanes-Woolf mit 50 μmol/l (Abb. 119 a und 119 b).

3.4.4.8 K_m -Werte für Coenzym A

Sowohl mit dem Substrat 4-Cumarsäure als auch mit Kaffeesäure kann für Coenzym A ein apparenter K_m -Wert von 2 μmol/l angegeben werden. Die Sättigungskonzentration wird bei 20 μmol/l (Substrat 4-Cumarsäure) respektive 40 μmol/l (Substrat Kaffeesäure) erreicht (Abb. 120 und 121).

Zur Ermittlung des K_m -Wertes wurden die Daten nach der Methode von Hanes-Woolf linearisiert. Am Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der x-Achse kann bei dieser Kinetik der K_m -Wert abgelesen werden (Abb 120 a und 121 a). In jeden Messpunkt gingen 6 Bestimmungen ein.

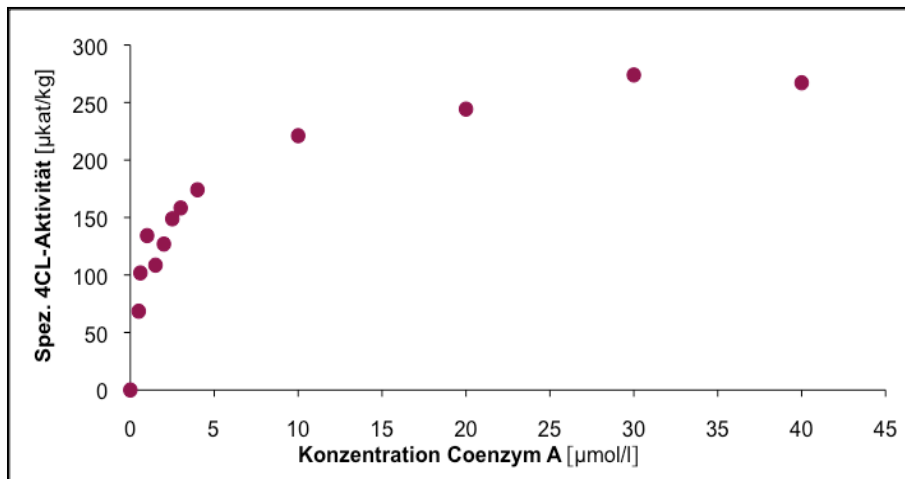


Abb. 120: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der 4CL von der Konzentration an Coenzym A im Testansatz mit dem Substrat 4-Cumarsäure

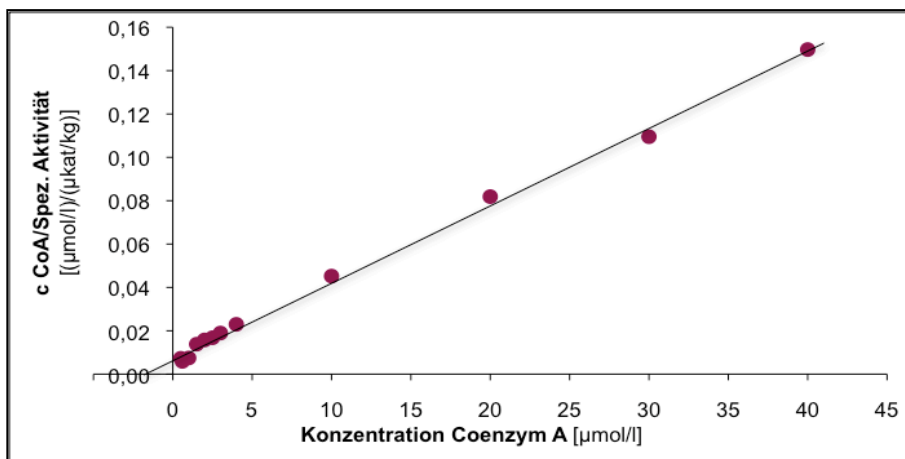


Abb. 120 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 120 nach Hanes-Woolf

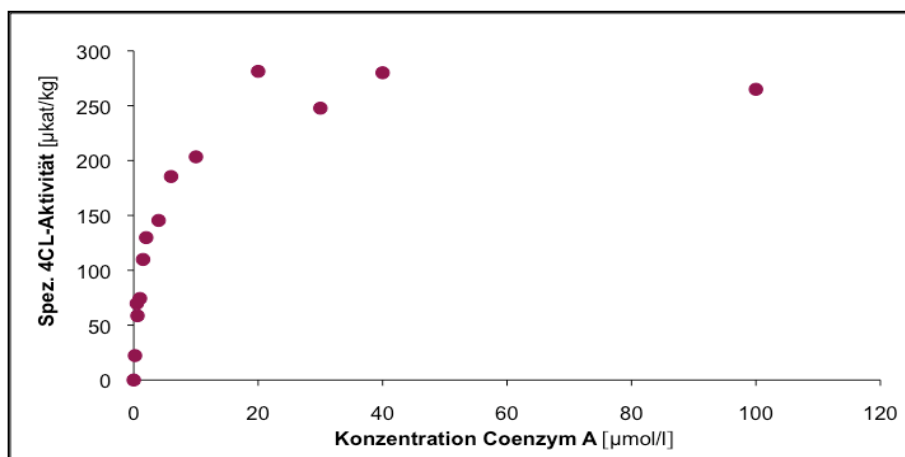


Abb. 121: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der 4CL von der Konzentration an Coenzym A im Testansatz mit dem Substrat Kaffeesäure

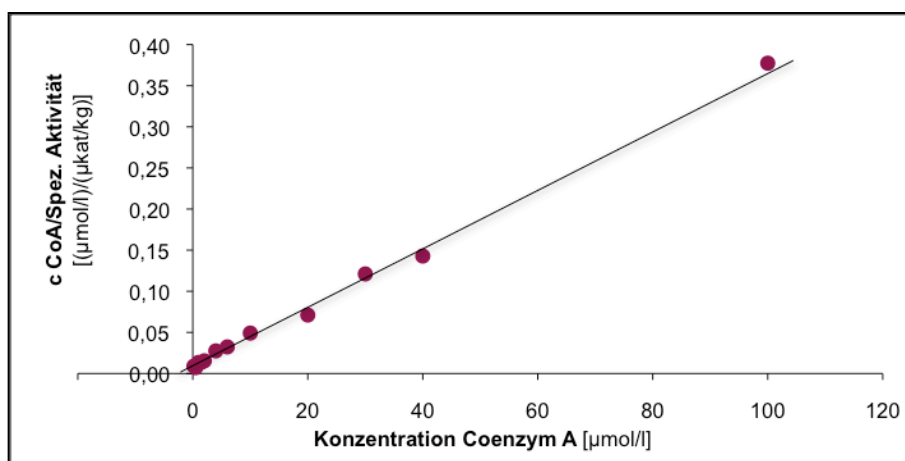


Abb. 121 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 121 nach Hanes-Woolf

3.4.5 Aufklärung der genomischen Sequenz der 4CL

Durch die in Kapitel 2.5.10 beschriebene Methode konnte die genomische Sequenz der 4CL aus *Melissa officinalis* aufgeklärt werden. Diese war identisch mit der cDNA-Volllänge, die in Abbildung 109 (Kap. 3.4.6.1) wiedergegeben ist.

Dass es sich bei dieser intronfreien Sequenz tatsächlich um die genomische Sequenz der 4CL handeln kann, wird in Kapitel 4.3.2 dargestellt.

3.4.6 Southern Blot-Analyse von Genkopien der 4CL

Der Phenylpropanoidstoffwechsel, bestehend aus den Enzymen PAL, C4H und 4CL, stellt in den Pflanzen den Übergang vom Primär- zum Sekundärstoffwechsel dar. Da die Produkte des Phenylpropanstoffwechsels wichtige Ausgangsstoffe für die Bildung von Ligninmonomeren, Flavonoiden, Anthocyanen und einer Vielzahl weiterer Stoffe sind, die häufig als Reaktion der Pflanze in Stresssituationen synthetisiert werden, muss ihre Transkription bei Bedarf schnell erfolgen können.

In vielen Pflanzen wurde das Auftreten von 4CL-Isoformen berichtet. Eines der ersten Beispiele ist die Sojabohne (*Glycine max*, Fabaceae), aus der Knobloch und Hahlbrock bereits 1975 zwei Isoformen isolieren konnten. Andere sind *Arabidopsis thaliana* mit drei Isoformen (Ehlting et al., 1999) oder Tabak (*Nicotiana tabacum*, Solanaceae) mit elf Isoformen (Lee und Douglas, 1996).

Um die Zahl der 4CL-Genkopien in *Melissa officinalis* zu klären, wurde, wie bereits zur Bestimmung der Zahl der PAL-Genkopien, die Methode des Southern Blotting gewählt (Kap. 2.6).

3.4.6.1 Herstellung einer DIG-markierten Sonde für 4CL

Zur Herstellung einer DIG-markierten 4CL-Sonde wurden die Primer 4CL-Nv und 4CL-Nr ausgewählt, die ein Stück von 625 Basen flankieren. In Abbildung 122 ist die genomische Vollständigensequenz der 4CL zu sehen. Sondenbereich und Primer sind optisch hervorgehoben.

ATGGAGAACCCGGCAGGCCAAGAAGAGATCATATTCCGATCCAAGCTCCCCGACATCTA
TATTCCAAAGCACCTCCCCTTACACTCGTATTGTTTCGAAAACATTTTCGAAATTCAGCA
CGCGGCCGTGCTTGATAAACGGGGCGACAGGCGACGTGTACACGTACGAGGAGGTCGAG
CTGACCGCGCGGAAAGTCGCAACGGGGCTTAGCCAGCTCGGCATCCAACAAGGCGAGAC
GATCATGCTCTTGCTCCCAAACCTCCCCGAGTACGTTTTTCGCGTTTCTAGGCGCGTCAT
ACATAGGTGCAGTCTCCACTATGGCAAATCCCTTTTTTGCCCCTGCCGAGGTAATCAAG
CAAGCCAAGGCCTCCGCCGCCAAGCTCATCATCACCCAAGCATGCTACGTGACAAGGT
GGGAGATTACGCCTCCGACAACGGAGTGAAGGTTATGTGCATCGACGCGCCGCCGCCCG
GGTGCTGCCGTTCTCGGAGCTGACGTGCGCCGACGAGCGCGACATGCCGGCGGTGAAG
ATACACCCGGAGGACGCGGTGGCGCTGCCGTACTCTTCCGGGACGACGGGGCTGCCCAA
GGGCGTGATGCTCACGCACAAGGGGCTGGTGACGAGTGTGGCGCAGCAGGTCGACGGAG

Primer 4CL Nv

AGAATCCGAACCTGTACATTCATAGCGAGGATGTCATGCTGTGCGTGCTGCCCTTATTT
CACATATACTCGCTCAACTCCGTTTTGCTGTGCGGGTTGCGGGTCGGGGCGGCGATCTT
GATCATGCAGAAATTCGACATCGTTCCGTTTTTGAGCTGATGCAGAAGTACAAAGTGA

BclI

CCATCGGGCCCTTCGTGCCGTCGATAGTTCTGGCCATCGCCAAGAGTCCGTTGGTGGGT
AAATATGACATTTTCATCTGTGCGGATGGCGATGTCCGGCGCGGCGCCGCTAGGGAAGGA
GCTGGAGGATTCTGTGAGGACTAAGTTTCCCAATGCAAACTTGGACAGGGTTATGGGA
TGACTGAAGCAGGGCCAGTGTATCAATGTGCCTAGCGTTTGCAAAAGAGCCATTCGAG
ATAAAATCAGGAGCATGTGGAAGTGTGTAAGAAATGCTGAAGTGAAAATTGTTGATCC
TGAAACTGGTGCTTCTCTAGGGCGTAATCAATCCGGAGAGATTTGCATTAGAGGGGACC
AGATTATGAAAGGTTATCTGAACGATCTGGAGTCAACAAAGAGGACCATAGACCATGAC
GGATGGCTGCACACGGGCGACATAGGATTCATTGATGCTGACGACGAGCTCTTCATCGT

Primer 4CL Nr

CGATCGATTGAAGGAAATAATCAAATACAAAGGGTTCCAAGTTGCGCCAGCTGAAATCG
AAGCCCTCCTCCTTAGTCATCCATACATCTCCGACGCTGCAGTTGTCTCAATGCAAGAT
GAGCAAGCTGGAGAAGTCCCTGTTGCTTTTTGTTGTGAGATCGAATGGTTCCACCATTAC
TGAGGATGAAATCAAGCAATTCATCTCGAAACAGGTTGTTTTCTACAAGCGAATAAATC
GTGTATTTTTTCATTGATGCAATTCCTCAAGTCTCCATCAGGGAAAATATTGAGAAAGGAT
TTGAGATCAAGATTAGCAGCTGCAGTCTAA

Abb. 122: Genomische Sequenz der 4CL. Sondenbereich und Primer sind optisch hervorgehoben.

Für den Restriktionsverdau der genomischen DNA wurden mit *Bam*HI, *Bgl*II, *Hind*III, *Eco*RI, *Mlu*I, *Nde*I und *Xho*I Enzyme ausgewählt, die nicht im Bereich der Sonde schneiden. Daher kann aus der Zahl der Banden pro Spur unmittelbar auf die Anzahl vorhan-

dener Genkopien geschlossen werden. *BclI* schneidet einmal im Bereich der Sonde, weshalb in dieser Spur doppelt so viele Banden wie Genkopien sichtbar sein sollten.

3.4.6.2 Ergebnis des Southern Blot

Abbildung 123 zeigt die besten Ergebnisse des Southern Blottings. Es sind jeweils zwei oder drei Banden in jeden Spuren der Restriktionsenzyme zu sehen, die im Bereich der Sonde nicht schneiden. In der Spur von *BclI* sind vier Banden zu erkennen. Die *NdeI*-Spuren zeigen zwei oder möglicherweise vier Banden.

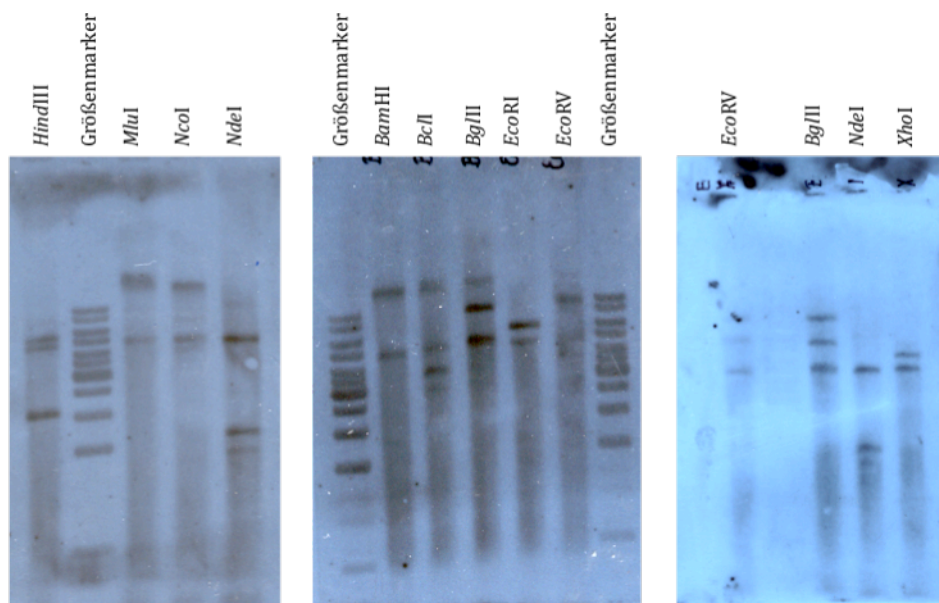


Abb. 123: Southern Blot mit 4CL-Sonde

Mithilfe der verwendeten Sonde kann gezeigt werden, dass die 4CL im Genom der Suspensionskulturzellen von *Melissa officinalis* vermutlich in zwei Genkopien auftritt. Eine dritte Bande, wie sie in den Spuren von *HindIII* und *BglII* zu sehen ist, könnte durch eine zusätzliche Schnittstelle in der zweiten Isoform bedingt sein.

Ob die genomische Sequenz der 4CL tatsächlich aufgeklärt werden konnte, muss noch einmal kritisch geprüft werden (vgl. Kap. 4.3.2). Erst danach ist eine sichere Interpretation des Southern Blot möglich. Enthält die *NdeI*-Spur tatsächlich vier Banden, könnten diese auch von einer Schnittstelle in einem Intron stammen.

3.5 Klonierung der Rosmarinsäure Synthase

3.5.1 Klonierung der RAS-cDNA

Nachdem Petersen 2006 die Klonierung der *Coleus blumei*-RAS gelungen war, standen erstmals Primer für die cDNA-Vollängensequenz dieses Enzyms zur Verfügung (Berger et al., 2006). Tatsächlich war es möglich, mit den spezifischen Primern für die RAS aus *Coleus blumei* auch ein Stück erwarteter Größe (etwa 1300 bp) aus Melissen-cDNA zu amplifizieren.

Nach Ligation dieses DNA-Amplifikates in den Vektor pGEM®-T und Vermehrung in Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5α konnte aus dem Ergebnis der Sequenzierung die cDNA-Volllänge für die RAS aus *Melissa officinalis* abgeleitet werden.

Die Sequenz der RAS-cDNA lautet (Abb. 124):

```

atgaggatcgatatcaaggactcgacgatggtaaagccggcgggcgagacgccggggcggt      60
M R I D I K D S T M V K P A A E T P G G
agcgtgtggctgacaaatttgaacttgctatcgccggccaactaccacacactgagcgtg      120
S V W L T N L N L L S P A N Y H T L S V
cacttctaccaccacgacgggtcagaaaacttcttcgacgctgcggcggttgaaggaggcg      180
H F Y H H D G S E N F F D A A A L K E A
ctcagccgcgcctcgttgacttctacccttacgccggggcggtgaagctgaaagacaac      240
L S R A L V D F Y P Y A G R L K L K D N
cgcctcgagatcgactgcaacggcgaggagtgctgctggtggaggcgagagcgacggc      300
R L E I D C N G E G V L L V E A E S D G
gcggttggcgagctggggcgagttcgccccacgccccgacctcaaccttatcccccaagta      360
A L A E L G E F A P R P D L N L I P Q V
gattatgctaagggaatttccacgtaccgcgtcatgctttttcagctaacacgtttcaaa      420
D Y A K G I S T Y P L M L F Q L T R F K
tgcggcgggcgtgggcttaggcgtggcaaacgagcaccacttatccgacggcgctcgccgcc      480
C G G V G L G V A N E H H L S D G V A A
ctccacttcatcaacacgtggggcccacctcgccccgcggtccccgccccatccccctccg      540
L H F I N T W A H L A R G V P A P S P P
cctgtgttcgatcgccgctccctctccgccccgaaccgcccgaagccgcagttcagccac      600
P V F D R R S L S A R N P P K P Q F S H
gccgagtaccagccgcctcccaccctccccaccctctcaccgacaccgcgatcgccctac      660
A E Y Q P P P T L P T P L T D T A I A Y
tccaagctgaaggtcacccgcgatcagctcggcgcctcaaagccaagtgcctcgccggc      720
S K L K V T R D Q L G A L K A K C L A G
gacccttcgggaaaaccccgacgacttttcgaggtcctcgccggccacatctggcgctgc      780
D P S G K P R S T F E V L A G H I W R C
gtctgcgctgcccgcggcctgccggaggatcaggagacgaagctccacatccccttcgac      840
V C A A R G L P E D Q E T K L H I P F D
gggcgggcggaagctgcggtgccgccccgggtacttcggcaacgccatcttcttcgccacg      900
G R A K L R L P P G Y F G N A I F F A T
cccgtcgccacgtgcggcgagatcgagtcgaactcgctcgcacacgccgtgaagagagtc      960
P V A T C G E I E S N S L A H A V K R V
ggcgacgccattgctaggctagatgaggattacttgagatcgctcgattgattttttggag      1020
G D A I A R L D E D Y L R S S I D F L E
ttgcaggaggatatcagtaagcttgccgcagggggccacagtttccgggtgccctaatttg      1080
L Q E D I S K L A Q G A H S F R C P N L
tgggtgattagctgggtgcggctgccggtttatgagccggattttgggtgggggaaggcg      1140
W V I S W V R L P V Y E P D F G W G K A
gtgtatatggggccgtggggcgccggtttgaagggaagagttatctgctgccgaatccg      1200
V Y M G P W A A P F E G K S Y L L P N P

```

```

gataacgacggcagcttggttgcgcgattacgctgcacacgcagcatatggagcgcttt 1260
D N D G S L F V A I T L H T Q H M E R F
gagaagttgttttatgagatttga 1281
E K L F Y E I -

```

Abb. 124: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der RAS aus *Melissa officinalis*

Da Veränderungen im Bereich des 5'-Terminus aufgetreten waren, musste ein neuer forward-Primer mit *Bam*HI-Schnittstelle gestaltet werden. Der 3'-Terminus der Sequenz wurde durch RACE-PCR bestätigt. Abbildung 127, ein Sequenzvergleich der RAS aus *Melissa officinalis*- und *Coleus blumei*-Suspensionskulturen, verdeutlicht dies.

Die amplifizierte Vollängen-cDNA wurde zunächst im Vektor pGEM®-T in Bakterien vermehrt und schließlich in den Vektor pET15b umligiert.

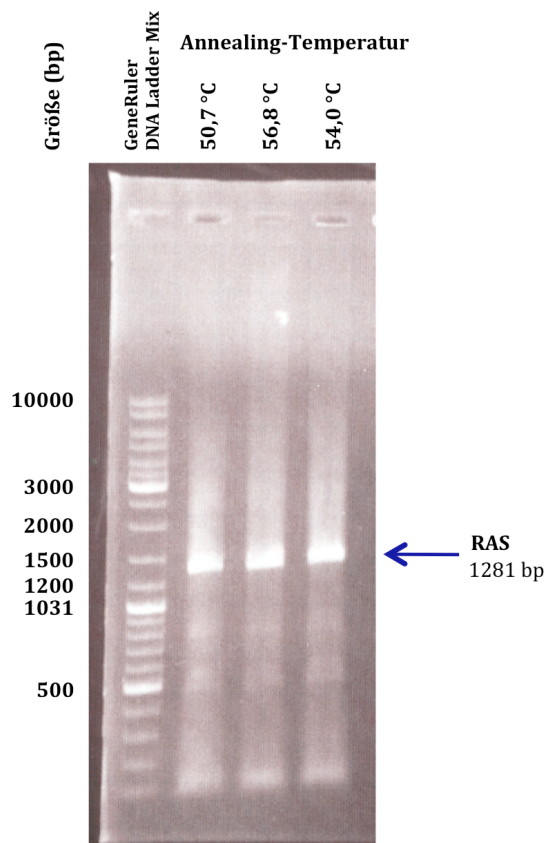


Abb. 125: Amplifikation der RAS-cDNA-Volllänge

3.5.2 Expression der rekombinanten RAS

Nachdem die RAS-cDNA in den Vektor pET15b umligiert worden war, wurde sie zunächst in *E. coli* des Stammes DH5α vermehrt. Durch Restriktionsverdau konnte gezeigt werden, dass das Umligieren in mehreren Fällen erfolgreich gewesen waren. Vier Plas-

mide, die nach der in Kapitel 2.4.13 beschriebenen Methode isoliert worden waren, konnten anschließend in *E. coli* des Stammes BL21(D3)pLysS eingebracht werden. Von diesen vier Klonen sollte zur Charakterisierung des Enzyms derjenige mit der höchsten RAS-Aktivität ausgewählt werden.

Hierzu wurden für jeden Klon zwei Bakterienkulturen vorbereitet, die parallel inokuliert und inkubiert wurden. Jeweils eine dieser beiden wurde nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C durch Zugabe von 1 mM IPTG (Kap. 2.5.4) induziert, ehe nach weiteren 5 Stunden alle Ansätze geerntet wurden. Der Aufschluss der Bakterien zur Gewinnung des Proteinrohextraktes erfolgte wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben.

Standardenzymtests zur Bestimmung der RAS-Aktivität (Kap. 2.3.8) enthielten die Substrate Caffeoyl-CoA (0,16 mmol/l) und pHPL (0,4 mmol/l) oder Caffeoyl-CoA (0,16 mmol/l) und Chinasäure (1,6 mmol/l). Inkubiert wurde für eine Reaktionszeit von 10 Minuten bei 30 °C. Die Proteinkonzentration der Testansätze lag zwischen 0,34 und 0,46 mg/ml Gesamtprotein.

Durch HPLC-Analyse konnte gezeigt werden, dass alle Klone Caffeoyl-CoA und pHPL zu Caffeoyl-4'-hydroxyphenyllactat (Caff-pHPL) umsetzen. Eine Umsetzung von Caffeoyl-CoA und Chinasäure zu Chlorogensäure konnte hingegen in keinem Fall beobachtet werden (Abb. 126). Spätere Versuche zeigten, dass auch Shikimisäure von der heterolog exprimierten RAS nicht als Substrat akzeptiert wird.

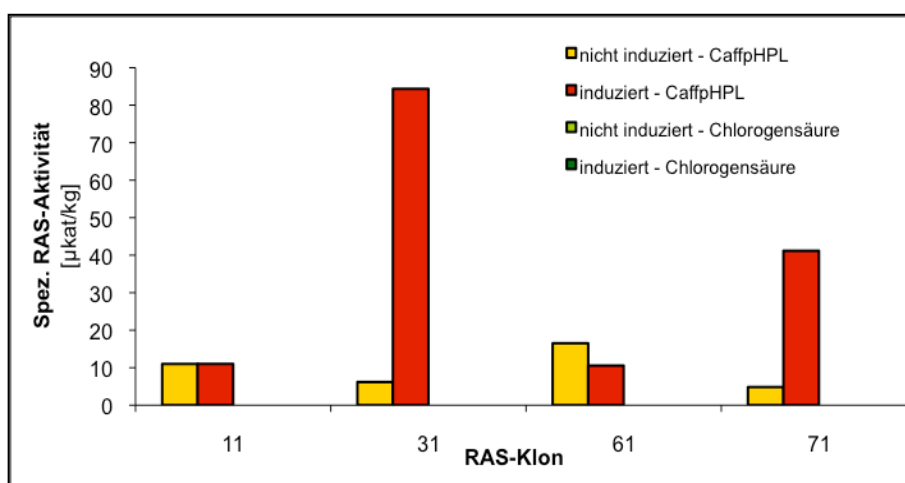


Abb. 126: Spezifische Aktivität der RAS aus den Klonen 11, 31, 61 und 71 in Abhängigkeit von Induktion der Bakterienkultur und Substratangebot

Aus Abbildung 126 geht hervor, dass RAS-Klon „31“ die höchste spezifische Enzymaktivität besitzt. Dieser Klon wurde zur Charakterisierung des heterolog exprimierten Enzyms (Kap. 3.5.5) ausgewählt.

3.5.3 Sequenzvergleich der RAS

Die RAS der Melisse verfügt über ein offenes Leseraster von 1281 Basenpaaren, die ein Protein aus 427 Aminosäuren codieren. Das errechnete Molekulargewicht des Enzyms beträgt 47,1 kDa, der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei pH 6,11.

Zur RAS-Nukleotidsequenz aus *Coleus blumei* besteht eine sehr hohe Ähnlichkeit. Die Identität beträgt 84 %. Abbildung 127 gibt ein Alignment beider Nukleotidsequenzen wieder. Gleiche Basen sind mit einem Stern (*) markiert.

Melissa	ATGAGGATCGATATCAAGGACTCGACGATGGTAAAGCCGGCGGGACGCCGGGCGGT	60
Coleus	ATGAAGATAGAAGTCAAAGACTCGACTATGATAAAGCCGTGCGCGGGACGCCGGGGGG	60
	**** *	
Melissa	AGCGTGTGGCTGACAAATTTGAACTTGCTATCGCCGGCCAACTACCACACACTGAGCGTG	120
Coleus	AGTTTGTGGCTCTCAAATTTGGACTTGTTGTGCGCCGGCCAACTACCACACCTCAGCGTG	120
	** *	
Melissa	CATTCTACCACCACGACGGGTCAGAAACTTCTTCGACGCTGCGGCGTTGAAGGAGGCG	180
Coleus	CATTCTACAGCCACGACGGCTCCGACAACCTTCTTCGACGCGGCGGGTTGAAGGAGTCG	180
	* *	
Melissa	CTCAGCCGCGCCCTCGTTGACTTCTACCCCTACGCGGGCGGCTGAAGCTGAAAGACAAC	240
Coleus	CTCAGCCGAGCTCTGGTTGAGTTCTACCCCTACGCGGGGAGGTTGAAGCTGAACGGCAAC	240
	* *	
Melissa	CGCCTCGAGATCGACTGCAACGGCGAGGGAGTGCTGCTGGTGGAGGCGGAGAGCGACGGC	300
Coleus	CGCCTCGAGATCGACTGTAACAACGAGGGGTTGCTGTTGGTGGAGGCGGAGTGCGACGGC	300
	* *	
Melissa	GCGTTGGCGGAGCTGGGCGAGTTGCGCCACGCCCCGACCTCAACCTTATCCCCCAAGTA	360
Coleus	GCGTTGGATGAGCTCGGCGACTTCGCCCCCGCCCGAGCTCAACCTCATCCCTAAAGTG	360
	* *	
Melissa	GATTATGCTAAGGAATTTCCACGTACCCGCTCATGCTTTTTTCAGCTAACACGTTTCAAA	420
Coleus	GATTATTCTGAGGAATTTCCACATACCTCTCATGGTTTTTCAGCTAACTCGCTTCAAA	420
	* *	
Melissa	TGCGGCGGCGTGGGCTTAGGCGTGCAAACGAGCACCCTTATCCGACGGCGTCGCCGCC	480
Coleus	TGCGGCGGAGTCGCTCTAGGCGTCGCAAACGAGCACCCTTATCCGACGGCGTCGCCGCC	480
	* *	
Melissa	CTCCACTTCATCAACACGTGGGCCCCACCTCGCCCGCGGCGTCCCCGCCCCATCCCCTCCG	540
Coleus	CTCCACTTCATCAACACATGGGCCCCACCTCAGCCGCGGCGCCCCGCCCCATCCCCTCCG	540
	* *	
Melissa	CCTGTGTTTCGATCGCCGCTCCCTCTCCGCCCCGAACCCGCCGAAGCCGAGTTCAGCCAC	600
Coleus	CCGACTTCGACCGCAGCTCCCTCTCCGCTCGCAACCCACCGCAGCCGAGTTCAGCCAC	600
	* *	
Melissa	GCCGAGTACCAGCCGCTCCACCCCTCCCCACCCCTCTCACCACACCGCGATCGCCAC	660
Coleus	GCCGAGTACCAGCCTCCTCCACTCTCGAAAACCCTCTTCCCCACACCGACATCGCCAC	660
	* *	
Melissa	TCCAAGCTGAAGGTCACCCGCGATCAGCTCGGCGCCCTCAAAGCCAAGTGC-----	711
Coleus	TCCCGGTTCAAGCTCACCCGCGACAGCTCAACTCCCTCAAGTCCAAATTCAAACCGCC	720
	* *	
Melissa	CTCGCCGCGACCCCTTCGGGAAAACCCCGCAGCACTTTCGAGGTCTCGCCGGCCACATC	771
Coleus	CCCGCCGACGGCGGCGCGGCAAAATCCTACAGCACGTTTCGAGGTCTTGGCCGCCATATC	780
	* *	

Ergebnisse

Melissa	TGGCGCTGCGTCTGCGCTGCCCCGCGGCTGCCGGAGGATCAGGAGACGAAGCTCCACATC	831
Coleus	TGGCGCAGCGTCTGCATCGCCCCGCGGCTGCCGGAGGGTCAAGAGACCAAGCTCCACATC	840

Melissa	CCCTTCGACGGGCGGGCGAAGCTGCGGCTGCCGCCGGGTACTTCGGCAACGCCATCTTC	891
Coleus	CCCTTCGACGGCCGCGGCGAGGCTGCAGCTGCCGCCGGGATTCTTCGGCAACGCCATCTTC	900

Melissa	TTCGCCACGCCCGTCGCCACGTGCGGCGAGATCGAGTCGAACTCGCTCGCACACGCCGTG	960
Coleus	TTCGCCACTCCCATCGCCACGTGCGGCGAGATCGAGTCGAACTCGCTGAATTACGCCGTG	960

Melissa	AAGAGAGTCGGCGACGCCATTGCTAGGCTAGATGAGGATTACTTGAGATCGTCGATTGAT	1011
Coleus	CGTAGAGTCAGCGACGGCGTGAGCCGGCTGGATGAGGACTACCTGCGATCGTCGATCGAT	1020

Melissa	TTTTTGGAGTTGCAGGAGGATATCAGTAAGCTTGCGCAGGGGGCCACAGTTTCCGGTGC	1071
Coleus	TTCTTGGAGCTGCAGGAAGATATAAGCAAGCTGGCGCAGGGAGCTCACAGTTTCAGGTGC	1080
	**	
Melissa	CCTAATTTGTGGGTGATTAGCTGGGTGCGGCTGCCGGTTTATGAGCCGGATTTGGGTGG	1131
Coleus	CCTAATCTGTGGGTGATCAGTTGGGTGTGGCTGCCGATTTACGAGCCGGATTTGGGTGG	1140

Melissa	GGGAAGGCGGTGTATATGGGGCCGTGGGCGGCGCCGTTTGAAGGGAAGAGTTATCTGCTG	1191
Coleus	GGGAAGGCGGTGTATATGGGGCCGTGGGCGGCGCCGTTTGAAGGGAAGAGCTACCTTCTG	1200

Melissa	CCGAATCCGGATAACGACGGCAGCTTGTTTGTGCGGATTACGCTGCACACGCAGCATATG	1251
Coleus	CCTAACCCGAAAAAGATGGCAGCTTGTTCTGCTCCATCACTCTGCATAAGCAACACATG	1260
	**	
Melissa	GAGCGCTTTGAGAAGTTGTTTTATGAGATTGA	1284
Coleus	GAGAGATTGAGAAGTTGTTTTATGAGATTGA	1293

Abb. 127: Nukleotidsequenzen der RAS aus *Coleus blumei* und *Melissa officinalis*.

Eine andere Nukleotidsequenz mit hoher Identität ist die putative Alkohol-Acyltransferase aus *Lavandula angustifolia* (Identität 82 %) (EMBL-Eintrag: DQ886904) (Landmann und Schwab, unveröffentlicht).

3.5.4 Phylogenetische Analyse der RAS

Bei Abbildung 128 handelt es sich um ein Kladogramm von Hydroxycinnamoyltransferasen, deren Aktivität und Substratazeptanz nachgewiesen werden konnte. Die bislang bekannten Rosmarinsäure-Synthasen aus *Melissa officinalis*, *Coleus blumei*, *Coleus forskohlii* und *Perilla frutescens* bilden zusammen innerhalb des phylogenetischen Stammbaumes eine eigene Gruppe, deutlich abgegrenzt von den übrigen Hydroxycinnamoyltransferasen. Ihre Identität untereinander beträgt mehr als 80 %.

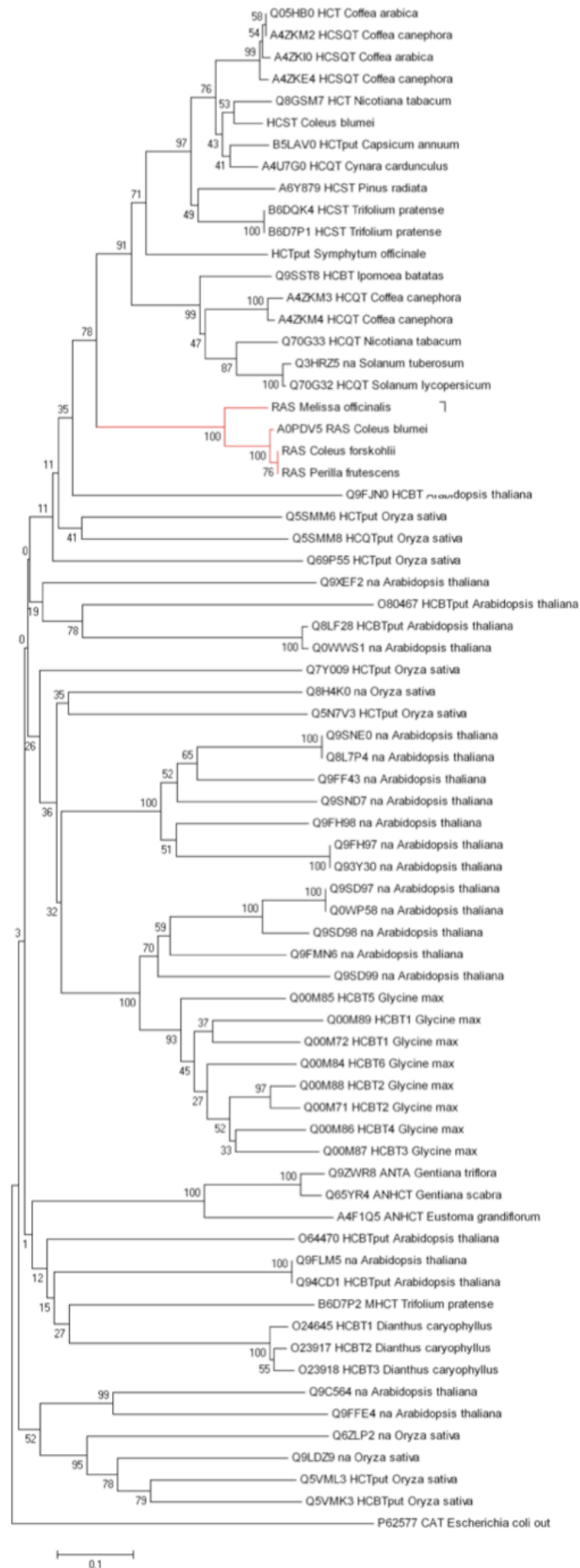


Abb. 128: Phylogenetischer Stammbaum von Hydroxycinnamoyltransferasen

3.5.5 Charakterisierung der heterolog exprimierten RAS

Die Charakterisierung der heterolog exprimierten RAS erfolgte aus dem Proteinrohextrakt (BRE). Parallel zu RAS-Klon 31, der aufgrund seiner hohen spezifischen Aktivität für die Charakterisierung der heterolog exprimierten RAS ausgewählt worden war (Kap. 3.5.3), wurden auch solche *E. coli* des Stammes BL21(D3)pLysS angezogen, die den Expressionsvektor pET15b ohne einligierte DNA enthielten.

Da in verschiedenen Enzymtests keine RAS-Aktivität oder RAS-ähnliche Aktivität der Kontrollbakterien registriert werden konnte, wurde für die Charakterisierung des Enzyms auf eine Reinigung des Proteinrohextraktes durch Affinitätschromatographie an einer Nickel-Matrix (Kap. 2.5.6) verzichtet.

3.5.5.1 Substratspezifitäten

Die aktivierten Hydroxyzimtsäure-Derivate Caffeoyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA wurden von der heterolog exprimierten RAS mit hoher Affinität umgesetzt. Auf Hydroxyphenyllactat-Seite akzeptierte das Enzym 4-Hydroxyphenyllactat und 3,4-Dihydroxyphenyllactat als Substrate. Chinasäure und Shikimisäure, die von den der RAS nahe verwandten Hydroxycinnamoyltransferasen umgesetzt werden, wurden von dem rekombinanten *Melissa officinalis*-Enzym nicht als Substrate akzeptiert.

3.5.5.2 Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration wurde ein Standardreaktionsansatz der RAS bei 30 °C über einen Zeitraum von 5 Minuten inkubiert. Ein linearer Reaktionsverlauf kann bis zu einer Proteinkonzentration von 0,4 mg/ml beobachtet werden, aber selbst bei Proteinkonzentrationen von 0,56 mg/ml kann unter diesen Bedingungen noch ein Anstieg der Aktivität festgestellt werden (Abb. 129).

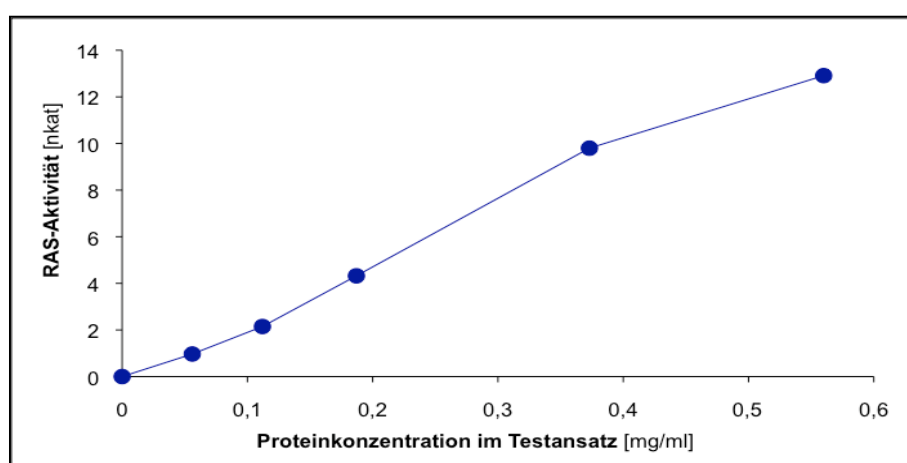


Abb. 129: Abhängigkeit der RAS-Aktivität von der Proteinkonzentration des Testansatzes

3.5.5.3 Temperaturoptimum

Das Temperaturoptimum des rekombinanten Enzyms liegt bei 45 °C und damit genau bei dem gleichen Wert, der auch im Proteinrohextrakt aus Suspensionskulturen (RE) für die RAS ermittelt werden konnte. Auffällig ist der steile Abfall der Enzymaktivität oberhalb des Temperaturoptimums (Abb. 130).

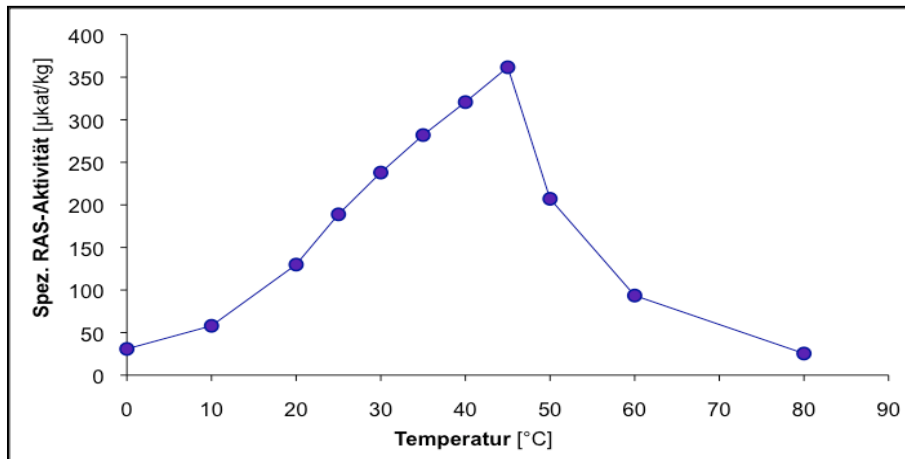


Abb. 130: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der Inkubationstemperatur

3.5.5.4 pH-Optimum

In 1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer wurde in einem breiten pH-Bereich von pH 1,95 bis 11,4 im Reaktionsansatz die höchste Enzymaktivität bei einem pH-Wert um 7,3 ermittelt. Die in Abbildung 131 dargestellte Kurve berücksichtigt 8 Messwerte für jeden getesteten pH-Wert.

Ein vergleichbares pH-Optimum konnte auch im RE aus Suspensionskulturzellen festgestellt werden.

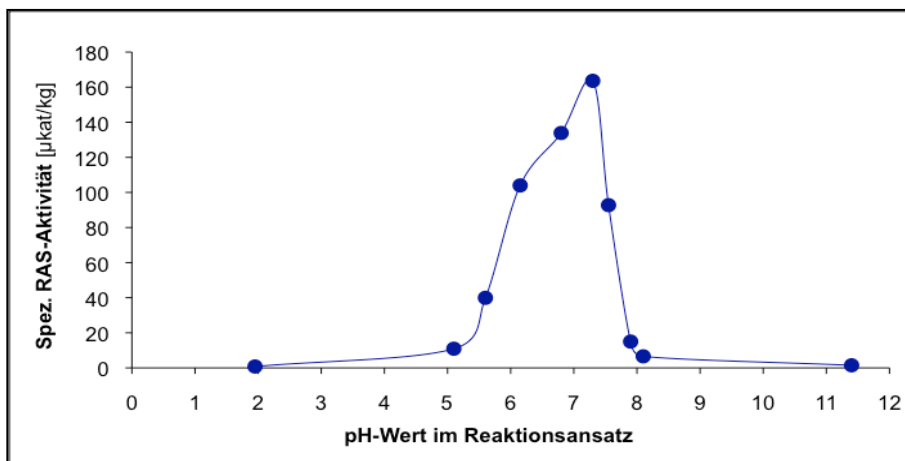


Abb. 131: Spezifische Aktivität der RAS in Abhängigkeit vom pH-Wert des Reaktionsansatzes

3.5.5.5 K_m -Werte für Caffeoyle-CoA

In einem Konzentrationsbereich von 0,36 bis 48 $\mu\text{mol/l}$ Caffeoyle-CoA konnte bei einer Reaktionszeit von 30 Sekunden und einer Temperatur von 30 °C ein apparenter K_m -Wert für Caffeoyle-CoA von 2 $\mu\text{mol/l}$ mit dem Substrat pHPL (0,4 mM) respektive 3 $\mu\text{mol/l}$ mit DHPL (0,4 mM) bestimmt werden. In beiden Fällen beruht die Berechnung auf der Methode von Hanes-Woolf (Abb. 132 a und 133 a). Die beiden Kurven (Abb. 132 und 133) zeigen Michaelis-Menten-Kinetik mit Sättigungskonzentrationen um 20 $\mu\text{mol/l}$. Die apparenten K_m -Werte für Caffeoyle-CoA können demnach gut mit den Werten verglichen werden, die für die RAS im RE ermittelt wurden. In die Berechnung gingen die Ergebnisse von 4 Messreihen ein.

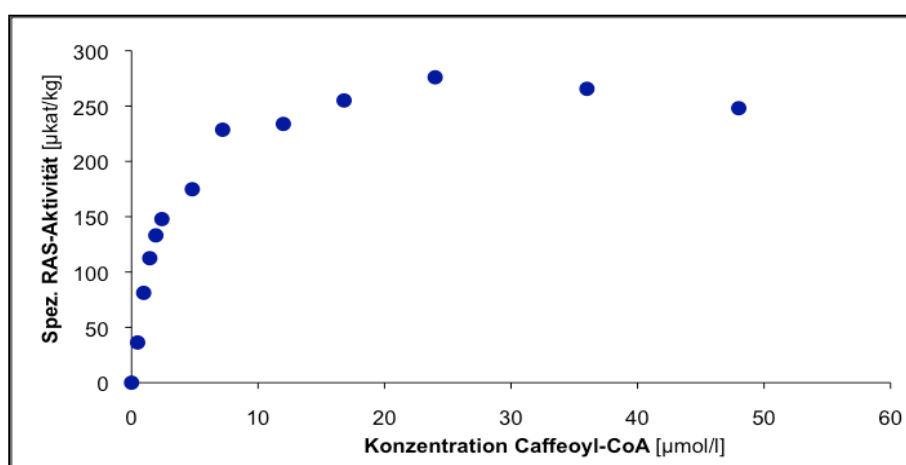


Abb. 132: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der Caffeoyle-CoA-Konzentration mit pHPL als Akzeptor

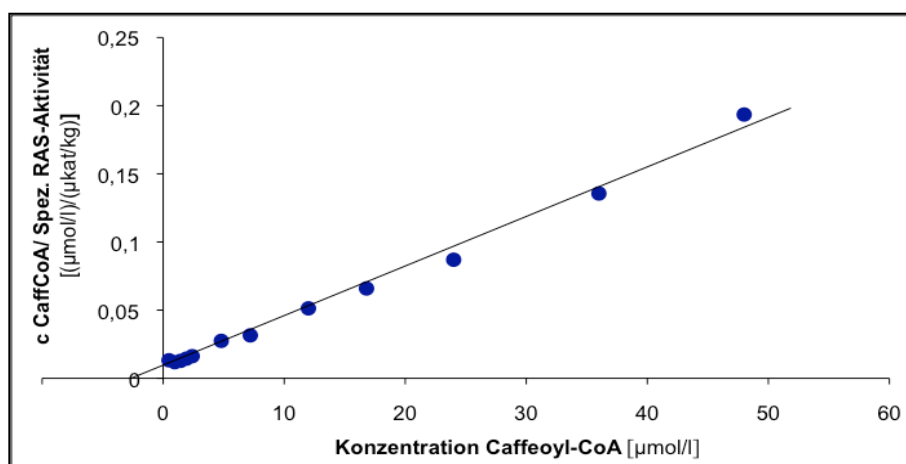


Abb. 132 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 132 nach Hanes-Woolf

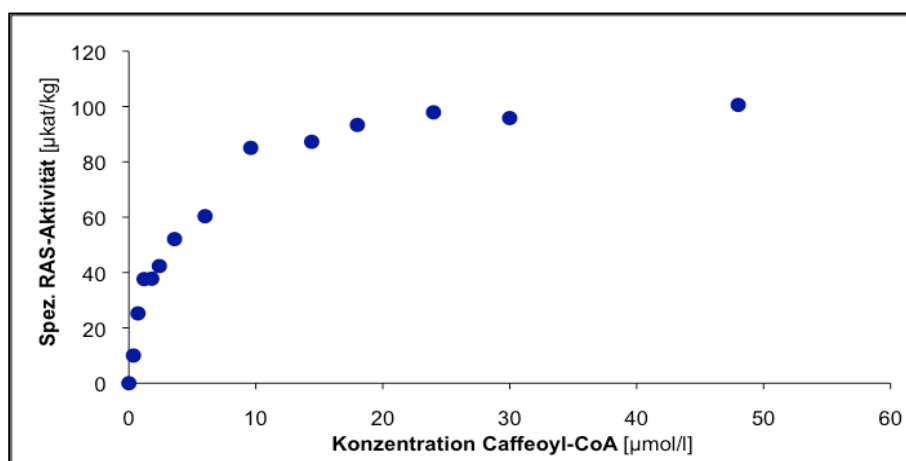


Abb. 133: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der Caffeoyl-CoA-Konzentration mit DHPL als Akzeptor

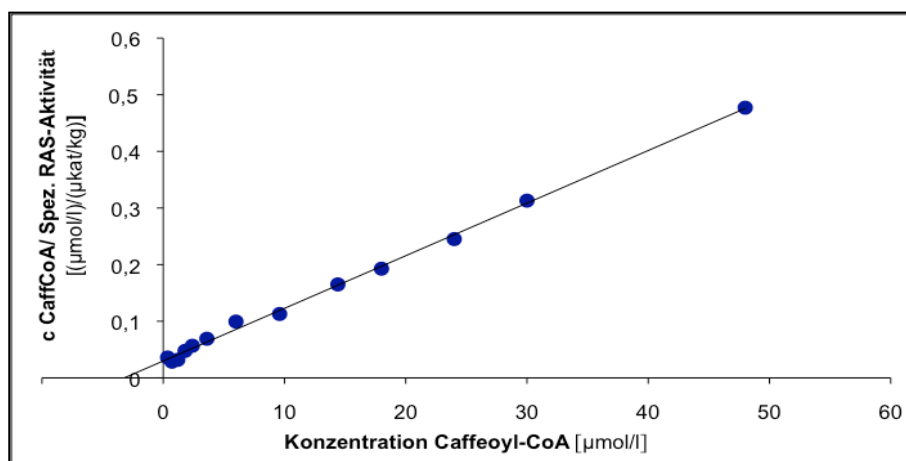


Abb. 133 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 133 nach Hanes-Woolf

3.5.5.6 K_m -Werte für 4-Cumaroyl-CoA

Ähnlich gut wie Caffeoyl-CoA wird auch 4-Cumaroyl-CoA (pCCoA) als Substrat akzeptiert. Zur Bestimmung des K_m -Wertes wurde ein Konzentrationsbereich von 1 bis 108 µmol/l gewählt, wenn pHPL als Akzeptorsubstrat im Reaktionsansatz vorhanden war, wohingegen die 4-Cumaroyl-CoA-Konzentration in Enzymtests mit DHPL maximal 32,4 µmol/l betrug. Die besten Ergebnisse konnten bei 30 °C und einer Reaktionszeit von 60 Sekunden erzielt werden.

Die Substratsättigungskurve mit pHPL als zweitem Substrat weist nach einem steilen Anstieg ein Maximum bei etwa 20 µmol/l 4-Cumaroyl-CoA auf und geht nach einem leichten Abfall der spezifischen Aktivität bei etwa 40 µmol/l in den Sättigungsbereich über (Abb. 134). Ob hier tatsächlich eine leichte Substrathemmung auftritt, kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden, obwohl in die Berechnung der Kurve die Ergebnisse von 8 Messreihen einfließen. Nach Linearisierung der Daten nach der Kinetik von Ha-

nes-Woolf beträgt der apparente K_m -Wert für 4-Cumaroyl-CoA in Reaktion mit pHPL 7 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 134 a).

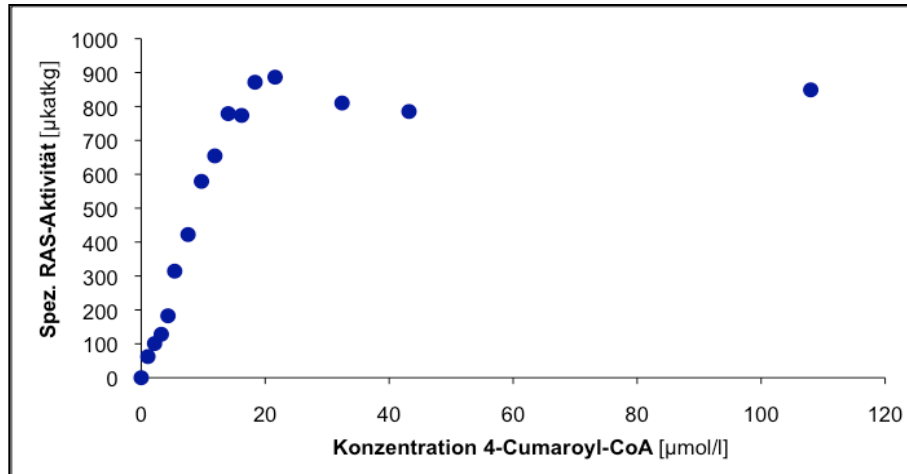


Abb. 134: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der Konzentration an 4-Cumaroyl-CoA im Testansatz mit pHPL als zweitem Substrat

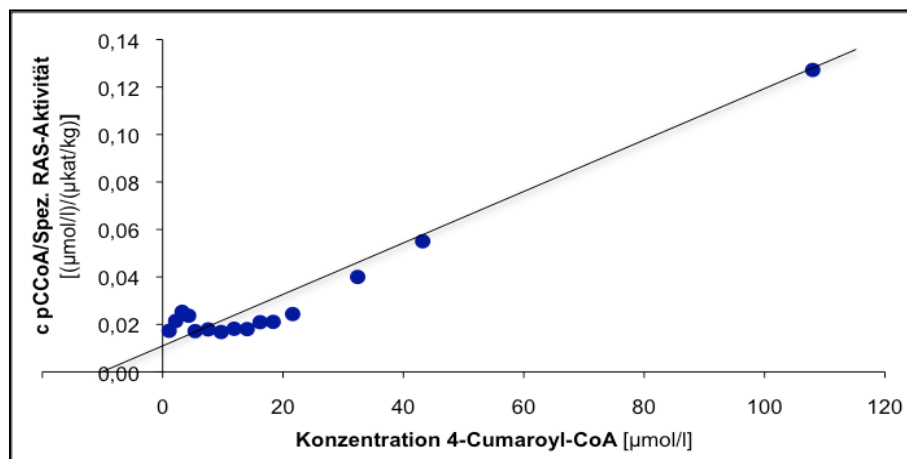


Abb. 134 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 134 nach Hanes-Woolf

Mit DHPL kann für 4-Cumaroyl-CoA ein apparenter K_m -Wert von 3 $\mu\text{mol/l}$ und eine Sättigungskonzentration von 12 $\mu\text{mol/l}$ angegeben werden. Die Berechnung erfolgte nach der Methode von Hanes-Woolf unter Berücksichtigung von 3 Messwerten für jeden Datenpunkt (Abb. 135 und 135 a).

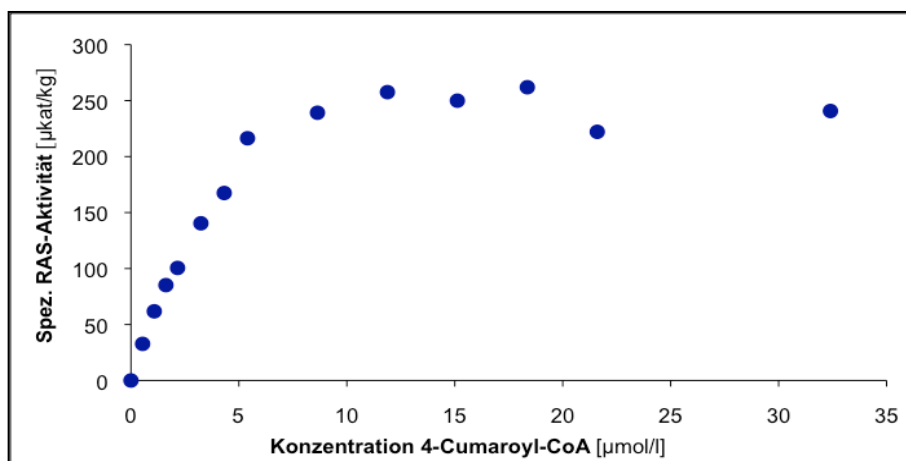


Abb. 135: Substratsättigungskurve der RAS für das Substrat 4-Cumaroyl-CoA mit DHPL als zweitem Substrat

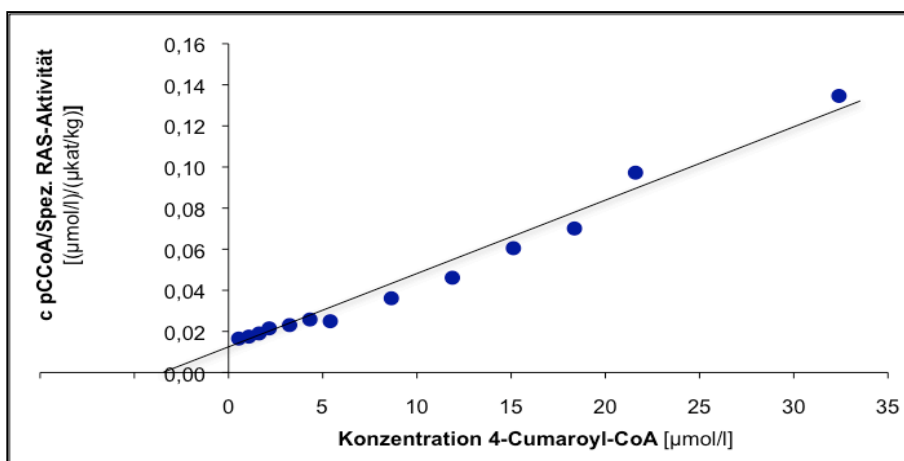


Abb. 135 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 135 nach Hanes-Woolf

3.5.5.7 K_m -Werte für pHPL

Bereits bei der Charakterisierung der RAS aus pflanzlichen Proteinrohextrakten (vgl. Kapitel 3.2.6) fiel auf, dass die K_m -Werte für pHPL in großem Maße vom beteiligten Hydroxymätsäure-Derivat abhängig sind. Dieses Phänomen konnte auch mit dem heterolog exprimiertem Enzym beobachtet werden. So beträgt der apparente K_m -Wert für pHPL mit Caffeoyl-CoA, berechnet nach Hanes-Woolf, 165 µmol/l (Abb. 136 a). Nach der gleichen Methode kann in Reaktion mit 4-Cumaroyl-CoA für pHPL ein Wert von 12 µmol/l ermittelt werden (Abb. 137 a). Die in Abbildung 137 dargestellte Sättigungskurve für pHPL mit 4-Cumaroyl-CoA geht bei 30 µmol/l in den Sättigungsbereich über, wohingegen in Reaktion mit Caffeoyl-CoA noch oberhalb von 400 µmol/l pHPL eine leichte Zunahme der spezifischen Enzymaktivität beobachtet werden kann (Abb. 136).

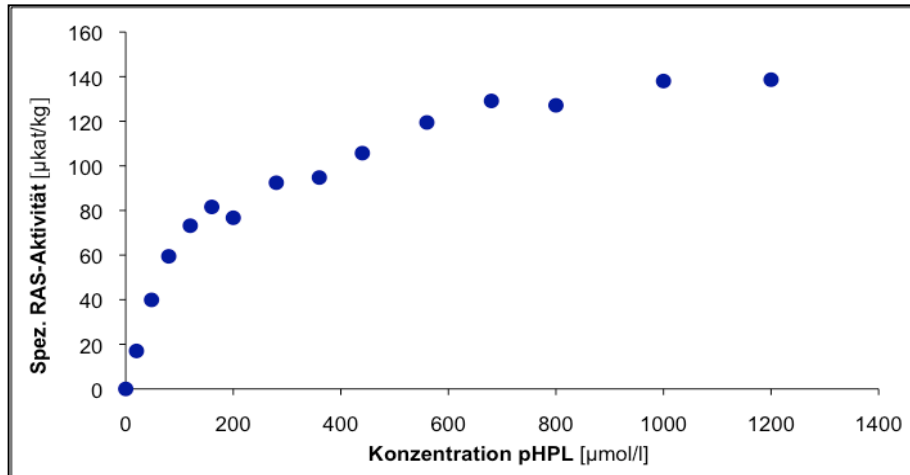


Abb. 136: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der pHPL-Konzentration im Testansatz mit Caffeoyl-CoA als zweitem Substrat

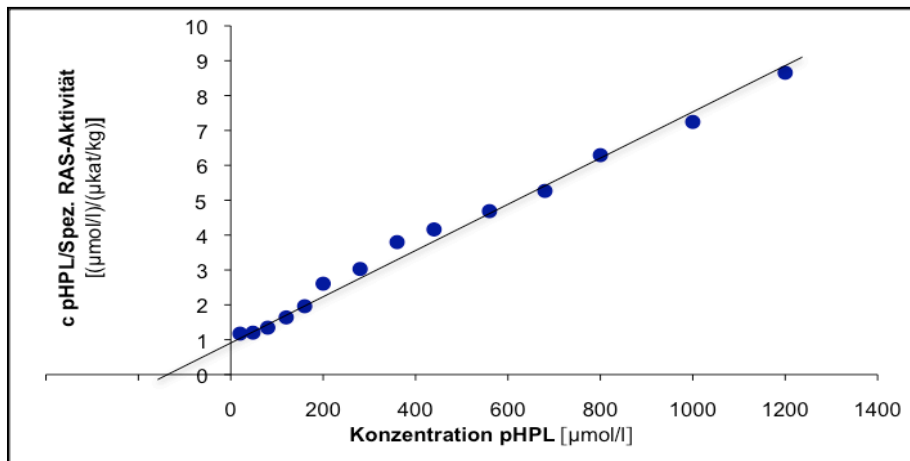


Abb. 136 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 136 nach Hanes-Woolf

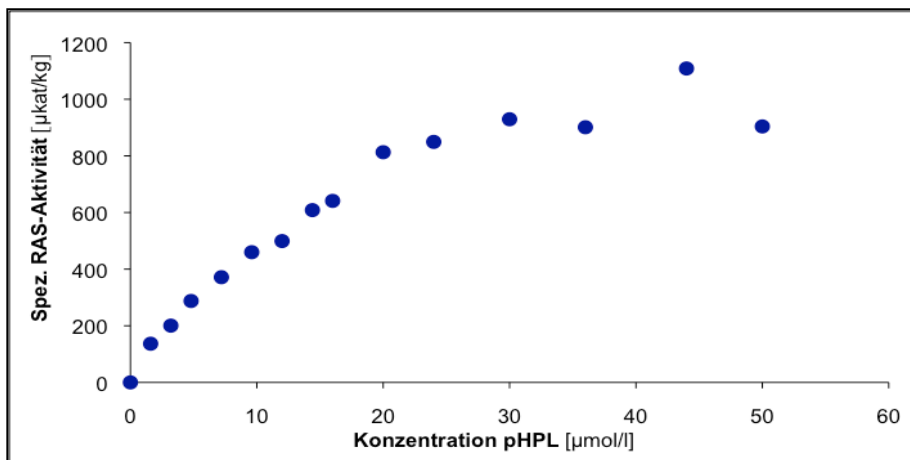


Abb. 137: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der pHPL-Konzentration mit 4-Cumaroyl-CoA als zweitem Substrat

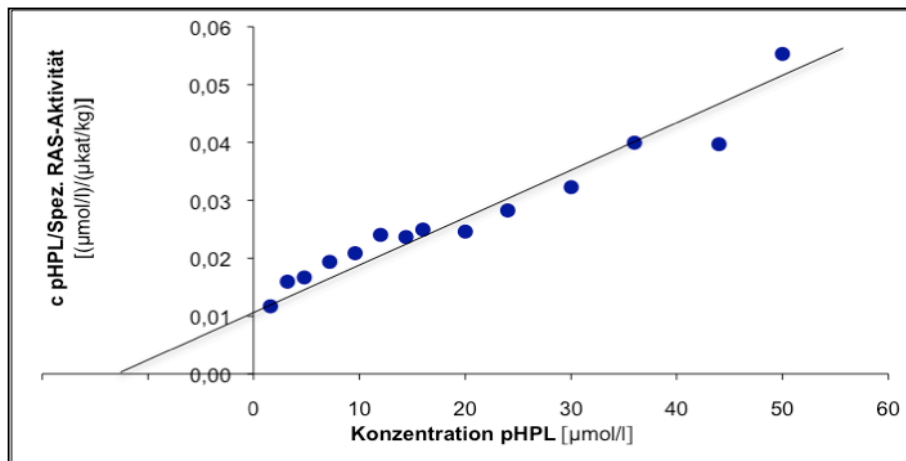


Abb. 137 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 137 nach Hanes-Woolf

3.5.5.8 K_m -Werte für DHPL

Die apparenten K_m -Werte für DHPL wurden in Konzentrationsbereichen zwischen 8 und 776 $\mu\text{mol/l}$ mit dem Substrat Caffeoyl-CoA beziehungsweise 14 bis 880 $\mu\text{mol/l}$ mit 4-Cumaroyl-CoA bestimmt. Die besten Ergebnisse wurden bei Reaktionszeiten von 30 Sekunden (mit Caffeoyl-CoA) oder 60 s (mit 4-Cumaroyl-CoA) erzielt. Wie üblich wurde bei 30 °C inkubiert.

Durch 4 Messungen für jeden Messwert konnte in Reaktion mit Caffeoyl-CoA die in Abbildung 138 dargestellte Kurve ermittelt werden. Es ist zu erkennen, dass unter den genannten Bedingungen bei etwa 300 $\mu\text{mol/l}$ DHPL die Sättigungskonzentration erreicht wird. Nach Linearisierung der Ergebnisse nach der Methode von Hanes-Woolf kann ein apparenter K_m -Wert für DHPL von 100 $\mu\text{mol/l}$ errechnet werden (Abb. 138 a).

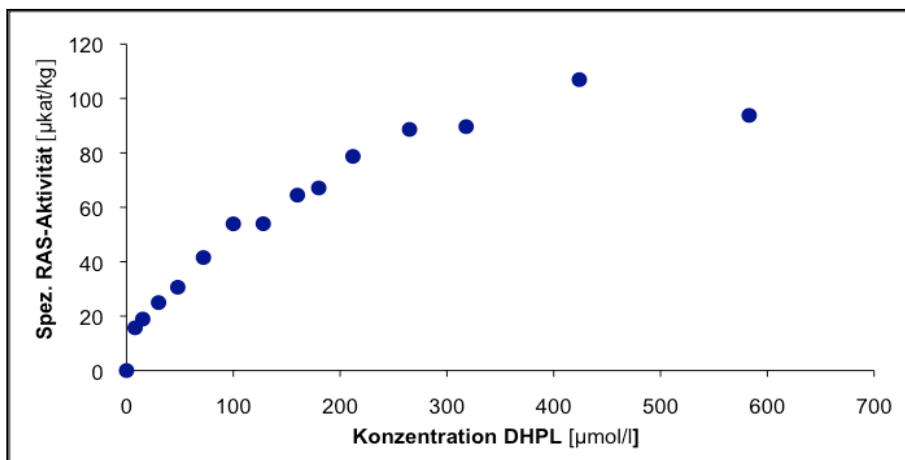


Abb. 138: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der DHPL-Konzentration mit Caffeoyl-CoA als zweitem Substrat

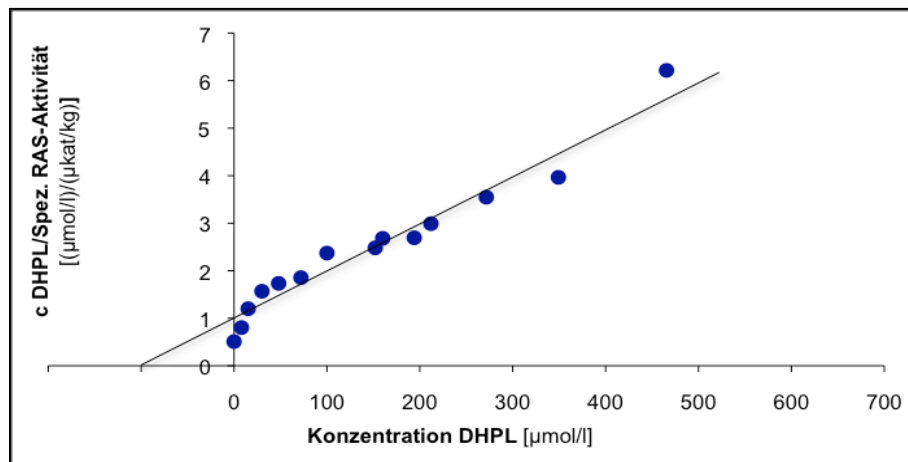


Abb. 138 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 138 nach Hanes-Woolf

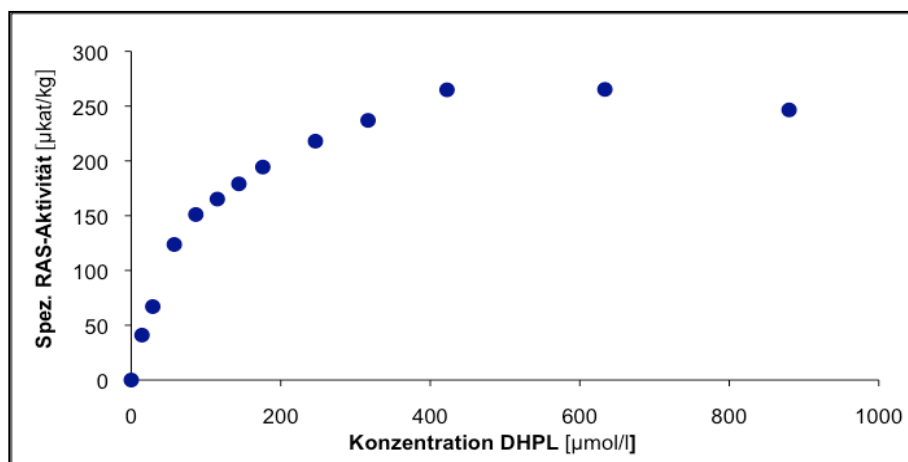


Abb. 139: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der RAS von der DHPL-Konzentration mit 4-Cumaroyl-CoA als zweitem Substrat

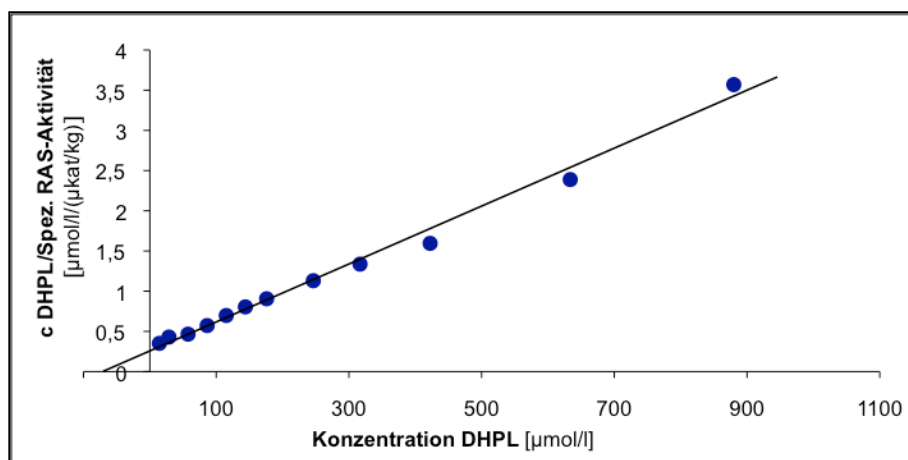


Abb. 139 a: Linearisierung der Daten aus Abb. 139 nach der Methode von Hanes-Woolf

Wird anstelle von Caffeoyl-CoA 4-Cumaroyl-CoA als Substrat angeboten, kann für DHPL nach der Methode von Hanes-Woolf ein apparenter K_m -Wert von 70 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt werden (Abb. 139 a) und nach Linearisierung nach Lineweaver-Burk ein Wert von 100 $\mu\text{mol/l}$. Die Sättigungskonzentration liegt mit etwa 400 $\mu\text{mol/l}$ höher als diejenige, die in Reaktionen mit Caffeoyl-CoA erreicht wurde (Abb. 139). In die Berechnung der Werte gingen 4 Messreihen ein.

3.5.6 Southern Blot-Analyse für Genkopien der Rosmarinsäure Synthase

Die Rosmarinsäure Synthase ist (vermutlich) eines der wenigen spezifischen Enzyme der Rosmarinsäure-Biosynthese. Daher sollte das Genom der Melisse auch auf Genkopien dieses Enzyms untersucht werden. Obwohl die genomische Sequenz der RAS aus *Coleus blumei*-Suspensionskulturzellen bekannt ist, gelang es nicht, auch die Vollängensequenz der RAS aus Melisse zu amplifizieren und aufzuklären. Es muss also in den folgenden Betrachtungen stets von der cDNA-Sequenz ausgegangen werden.

3.5.6.1 DIG-markierte RAS-Sonde

Für die Synthese einer DIG-markierten Sonde zum Auffinden möglicher Genkopien wurde eine Sequenz im Mittelteil der RAS mit 700 Basenpaaren Länge ausgewählt. Flankiert wird die Sequenz durch die Primer RAS Fn7 und RAS Rn6.

Abbildung 140 zeigt die RAS-cDNA-Volllänge. Nukleotide, die zur Sonde gehören, sind hervorgehoben, die Primer gesondert markiert.

```
ATGAGGATCGATATCAAGGACTCGACGATGGTAAAGCCGGCGGCGGAGACGCCGGGCGGTA
CGGTGTGGCTGACAAATTTGAACCTTGCTATCGCCGGCCAACTACCACACACTGAGCGTGCA
CTTCTACCACCACGACGGGTCAGAAAACCTTCTTCGACGCTGCGGCGTTGAAGGAGGCGCTC
AGCCGCGCCCTCGTTGACTTCTACCCTTACGCCGGGCGGCTGAAGCTGAAAGACAACCGCC
TCGAGATCGACTGCAACGGCGAGGGAGTGCTGCTGGTGGAGGCGGAGAGCGACGGCGCGTT
GGCGGAGCTGGGCGAGTTCGCCCCACGCCCGACCTCAACCTTATCCCCCAAGTAGATTAT
GCTAAGGGAATTTCCACGTACCCGCTCATGCTTTTTTCAGCTAACACGTTTCAAATGCGGCG
CGGTGGGCTTAGGCGTG
```

GCAAACGAGCACCCTTATCCGACGGCGTCGCCGCCCTCCACTT

Primer RAS Fn6

```
CATCAACACGTGGGCCCACCTCGCCCCGCGGCTCCCCGCCCATCCCCTCCGCCTGTGTTC
GATCGCCGCTCCCTCTCCGCCCGCAACCCGCCGAAGCCGAGTTCAGCCACGCCGAGTACC
AGCCGCCTCCCACCCTCCCCACCCCTCTCACCGACACCGCGATCGCCTACTCCAAGCTGAA
GGTCACCCGCGATCAGCTCGGCGCCCTCAAAGCCAAGTGCCTCGCCGGCGACCCCTTCGGGA
AAACCCCGCAGCACTTTCGAGGTCCTCGCCGGCCACATCTGGCGCTGCGTCTGCGCTGCCC
GCGGCCTGCCGGAGGATCAGGAGACGAAGCTCCACATCCCCTTCGACGGGCGGGCGAAGCT
GCGGCTGCCGCCGGGGTACTTCGGCAACGCCATCTTCTTCGCCACGCCCGTCCGCCACGTGC
GGCGAGATCGAGTCGAACTCGCTCGCACACGCCGTGAAGAGAGTCGGCGACGCCATTGCTA
GGCTAGATGAGGATTACTTGAGATCGTCGATTGATTTTTTGGAGTTGCAGGAGGATATCAG
TAAGCTTGCGCAGGGGGGCCACAGTTTCCGGTGCCCTAATTTGTGGGTGATTAGCTGGGTG
```

CGGCTGCCGGTTTATGAGCCGGATTTTGGGTGGGGGAAGGCGGTGTATATGGGGCCGTGGG

Primer RAS Rn6

CGGCGCCGTTTGAAGGGAAGAGTTATCTGCTGCCGAATCCGGATAACGACGGCAGCTTGTT
TGTCGCGATTACGCTGCACACGCAGCATATGGAGCGCTTTGAGAAGTTGTTTTATGAGATT
TGA

Abb. 140: Nukleotidsequenz der RAS-cDNA-Sequenz. Der Bereich der DIG-markierten Sonde ist hervorgehoben. Die flankierenden Primer sind markiert.

Zur Analyse von Isoformen wurde die genomische DNA mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Mlu*I und *Nde*I verdaut. Keines von ihnen schneidet im Bereich der RAS-cDNA.

3.5.6.2 Ergebnis des Southern Blot

Durch Southern Blot kann im Genom der Melisse lediglich eine Genkopie der RAS nachgewiesen werden. Dies geht aus Abbildung 141 deutlich hervor.

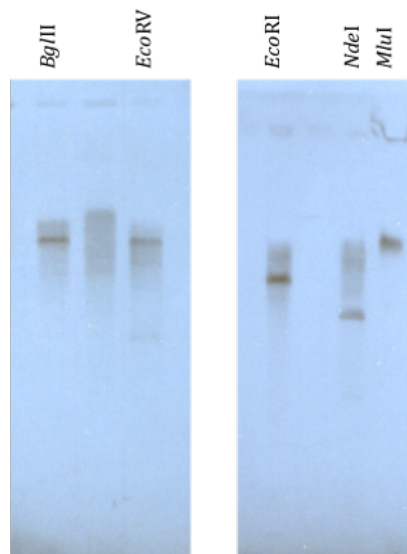


Abb. 140: Ergebnis des Southern Blot mit einer 700 bp langen DIG-markierten RAS-Sonde

4 Diskussion

4.1. Phenylalanin Ammoniak-Lyase

4.1.1 cDNA-Volllängensequenz und Proteinstruktur der Phenylalanin Ammoniak-Lyase

Mithilfe degenerierter Primer, die auf konservierte Regionen bekannter Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)-Sequenzen gerichtet waren, und durch anschließende RACE-PCR konnte eine PAL-cDNA aus Suspensionskulturen von *Melissa officinalis* isoliert, sequenziert und nach Überexpression in *E. coli* charakterisiert werden (Kap. 3.3).

Die ermittelte Sequenz zeigt sehr hohe Übereinstimmung mit PAL-Sequenzen anderer zweikeimblättriger Pflanzen, so dass auch ohne Untersuchung der Substratspezifität von einer PAL-Sequenz ausgegangen werden kann. Die größten Identitäten auf Nukleotidebene bestehen zu den PAL-Sequenzen, die aus *Agastache rugosa* (EMBL-Eintrag: AF326116) (87 %) (Kim et al., unveröffentlicht) und *Salvia miltiorrhiza* (EMBL-Eintrag: EF462460) (87 %) (Song und Wang, 2009) kloniert werden konnten. Diese beiden Pflanzen zählen ebenfalls zu den Lippenblütlern und werden wie Melisse insbesondere in Hinblick auf die Rosmarinsäure-Biosynthese untersucht.

Das aktive Zentrum der PAL besteht, wie Ritter und Schulz (2004) zeigen konnten, aus einem 4-Methyliden-imidazol-5-on (MIO), das aus dem Tripeptid Alanin–Serin–Glycin gebildet wird. Diese drei Aminosäuren finden sich entsprechend auch in einer konservierten Region im Bereich des aktiven Zentrums aller PAL-Sequenzen wieder: G-(STG)-(LIVM)-(STG)-(AC)-S-G-(DH)-L-x-P-L-(SA)-x(2)-(SAV) (Mahesh et al., 2006). Aus dieser postulierten hoch konservierten Sequenz geht hervor, dass die Aminosäure Alanin durch Cystein ersetzt sein kann (Langer et al., 1997).

Abbildung 142 zeigt den Vergleich von fünf PAL-cDNA-Sequenzen. Die konservierte Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums ist markiert und tritt, wie die Abbildung zeigt, nicht nur hoch konserviert in den PAL-Sequenzen der Lamiaceen, sondern beispielsweise auch in einer PAL-Sequenz aus *Rubus idaeus* (Rosaceae) (korrespondiert mit der Nukleotidsequenz des EMBL-Eintrags AF237955) (Kumar und Ellis, 2001), einer PAL-Sequenz aus der Einkeimblättrigen *Oryza sativa* subsp. *japonica* (EMBL-Eintrag: AK102817) (Kikuchi et al., 2003) und einer PAL-Proteinsequenz aus der Weihrauch-Kiefer (*Pinus taeda*) (EMBL-Eintrag: U39792) (Zhang und Chiang, unveröffentlicht), einer Gymnospermen, auf.

Diskussion

Melissa	---MAENGHHD-----SNGFCVKQN-----DPLNWVAAAESLKGSHLDEVKR	39
Salvia	--MAAENGHHEE-----SNGFCVKQN-----DPLNWVAAAESLKGSHLDEVKR	60
Rubus	MESITQNGHHHQNGIQNGSLDDGLCIKTESIKTGYSVSDPLNWGAAAESMTGSHLDEVRR	41
Oryza	---MAGNGPINKE-----DPLNWGAAAAMAGSHLDEVKR	32
Pinus	MVAAAIEITQANEVQVKSTGLCTDFGSSGS-----DPLNWVRAAKAMEGSHFEVKA	51
	: . ***** ** : ***:***:	
Melissa	MVEEFR-KPVVKLGGETLTISQVAAIAAKDN--AVAVELAESA-RAGVKASSDWVMESMN	95
Salvia	MVEEFR-KPVVKLGGETLTISQVAAIAAKDN--AVAVELVLESS-RAGVKASSDWVMESMS	97
Rubus	MVAEYR-KPVVKLGGETLTISQVAAIANHDS--GVKVELAESA-RAGVKASSDWVMDSMN	116
Oryza	MVAQFR-EPLVKIQGATLRVGQVAAVAQAKDAAGVAVELDEEA-RPRVKASSEWILNCIA	90
Pinus	MVDSYFGAKEISIEGKSLTISDVAAVARRSQ--VKVKLDAAAASRVEESSNWVLTQMT	108
	** .: .: * : * .:***:* .. * *: * : .: * : * *:***: :	
Melissa	KGTDSYGVTTGFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGNGTETNHTLPHTATRAAMLV	155
Salvia	KGTDSYGVTTGFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGNGTESNHTLPHTATRAAMLV	157
Rubus	KGTDSYGVTTGFGATSHRRTKQGAALQKELIRFLNAGVLRNGTESAHTLPHSATRAAMLV	176
Oryza	HGGDIYGVTTGFGTSHRRTKDGPALQVELLRHLNAGIFGTGSD-GHTLPSETVRAAMLV	149
Pinus	KGTDTYGVTTGFGATSHRRTNQGAELQKELIRFLNAGVLGKCPE--NVLSEDTTRAAMLV	166
	:* * *****.******:* ** **:*.******: . .: .:*. .:*****	
Melissa	RINTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNQNTITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNS	215
Salvia	RINTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNENITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNS	217
Rubus	RINTLLQGYSGIRFEILEAISKFLNHNITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNS	236
Oryza	RINTLLQGYSGIRFEILEAITKLNTGVTPLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNA	209
Pinus	RTNTLLQGYSGVRWDILETVEKLLNAWLTPKPLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNS	226
	* *****.*:***: *:* * : * *****.******.******:	
Melissa	KAVGPNGEPLTAEQAFKLAGVNGGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGLASIALFEANILAVL	275
Salvia	KAVGPNGEPLNAEEAFKLAGVKGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGLASIALFDANILAVL	277
Rubus	KAVGPKGETLNAAEAFQVGISGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGLASTVLFETNILALL	296
Oryza	QAISPDGRKVDAAEAFKLAGIEGGFFTLNPKEGLAIVNGTSVGSALAATVMFDANILAVL	269
Pinus	RVRSRDGIEMSGAEALKKVGLEK-PFELQPKEGLAIVNGTSVGAALASIVCFDANVLALL	285
	:. . .* : . :*: .*: * *:*****:**:*.**: . *:*:***:	
Melissa	SEVMSAIFAEVMNGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSGYVKAQKLHDMDP	335
Salvia	SEVMSAVFAEVMNGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSGYVKAQKLHEQDP	337
Rubus	SEILSAIFAEVMQKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQKLHEQDP	356
Oryza	SEVLSAVFCEVMNGKPEYTDHLTHKLKHHPGSIEAAAIMEHILAGSSFMHAKKVNEMDP	329
Pinus	SEVISAMFCEVMNGKPEFTDPLTHKLKHHPGQMEAAAIMEYVLDGSSYMKHAALKHEMNP	345
	:*.*.**:***:* *****.******:* **:.: * *:***: *	
Melissa	LQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRTATKMIEREINSVNDNPLIDVARSKAIHGGNFQG	395
Salvia	LQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRTATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQG	397
Rubus	LQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQG	416
Oryza	LLKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRAATKSIEREVNSVNDNPVIDVHRGKALHGGNFQG	389
Pinus	LQKPKQDRYGLRTSPQWLGPQVEIIRSATHMIEREINSVNDNPVIDVARDKALHGGNFQG	405
	* *****.******.*:* *: **:*****:* ** *.**:******	
Melissa	TPIGVSMDNARLAIASIGKLLFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPPLDYGFKGSEIAM	455
Salvia	TPIGVSMDNARLAIASIGKLLFAQFSELVNDLYNNGLPSNLSGGRNPPLDYGFKGSEIAM	457
Rubus	TPIGVSMDNRLAIASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRDPSLDYGFKGAEIAM	476
Oryza	TPIGVSMDNARLAIANIGKLMFAQFSELVNEFYNNGLTSNLAGSRNPPLDYGFKGTEIAM	449
Pinus	TPIGVSMDNLRLSISAIGKLMFAQFSELVNDYNNGLPSNLSGGPNPPLDYGLKGAEIAM	465
	***** **: **: **:*****: *.**.**:*. :*****.**:***	
Melissa	ASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTEALDILKLMSSTYLVGLCQA	515
Salvia	ASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTEALDILKLMSSTYLVALCQA	517
Rubus	ASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDILKLMSSTYLVALCQA	536
Oryza	ASYCSELQYLANPITNHVQSAEQHNQDVNSLGLVSARKTLEAVDILKLMSTYIVALCQA	509
Pinus	ASYTSELLYLANPVTSHVQSAEQHNQDVNSLGLVSARKSAEADILKLMSTYLTALCQA	525
	*** ** *:***.*.******.**: **: **:***** **:..****	
Melissa	IDLRHLEENLKHAVKNTVSQVAKRTLTMGANGELHPSRFCEKDLIRVVDREYVFAYIDDP	575
Salvia	VDLRHLEENLKHAVKNTVSQVAKRTLTMGVNGELHPSRFCEKDLIRVVDREYVFAYIDDP	577
Rubus	IDLRHLEENLKSTVKNTVSQVAKRVLTGTVNGELHPSRFCEKDLIMVVEREYLFAYIDDP	596
Oryza	VDLRHLEENIKSSVKNCVTQVAKVLTMTNPTGDLSSARFSEKNLLTAIDREAVFSYADDP	569
Pinus	VDLRHLEENMLATVKQIVSQVAKKTLSTGLNGELLPGRFCEKDLLQVVDNEHVFSYIDDP	585
	:*****: **: **:***:.. .*. * ..*.**: .:.* *: * *	

Melissa	CSATYPLMQKLRLQVLVEHALKNGEGEKNASTSIFQKIEAFEEELKTLLPKEVESARTALE	635
Salvia	SSATYPLMQKLRLQVLVDHALKNGDLEKNASTSIFQKIEAFEEELKALLPKEVGSARMALE	637
Rubus	CSATYPLMQKLRLQVLVEHALTNGENEKNASTSIFQKITAFEELKTILPKEVESARAAYE	656
Oryza	CSANYPLMQKLRAVLVEHALTSGDAEPEAS--VF\$KITKFEEELRSALPREIEAARVAVA	629
Pinus	CNASYPLTLQKLRLNILVEHAFKNAEGEKDPNTSIFNKIPVFEEAEAKAQLEPQVSLARESYD ..*.*** :.* :***:**... : * .. :*.* ** **: : * :: ** :	645
Melissa	SGNPAIANRIAECRSYPLYKFIREELGADFLTGEKVVSPGEECDKVFTALSNGLIIDPLL	695
Salvia	SGSPTVANRIAECRSYPLYKFIREQLGAGFLTGEKAVSPGEECEKVFTALSNGLIIDPLL	697
Rubus	SGNAAIPNRIVECRSYPLYKVFREELGGFEFLTGEKVRSPGEECDKVFTAMCQGNIIDPIL	716
Oryza	NGTAPVANRIVESRSFPLYRFVREELGCVFLTGEKCLKSPGEECNKVFLGISQGLKDIPML	687
Pinus	KGT\$PLPDRIQEGRSYPLYEFVRNQLGTKLLSGTRTISPGEVIEVVYDAISEDKVIVPLF .*****:* *.**:***.*:** :*:~ : **** : * : : * ~:	705
Melissa	ECLQGWNG-----APLPIC-----	709
Salvia	ECLQGWNG-----QPLPIC-----	711
Rubus	DCLSGWNG-----EPLPIC-----	730
Oryza	DCLKEWNG-----EPLPIN-----	701
Pinus	KCLDGWKGTLAHSEINNLRSPPLYNDICYDLSPRMILLMLLFSDPEFDWS .*** .:* **	754

Abb. 142: Beispielhafter Sequenzvergleich von PAL-Proteinsequenzen zweikeimblättriger (*Melissa*, *Salvia* und *Rubus*), einkeimblättriger (*Oryza*) und einer gymnospermen Pflanze (*Pinus*)

Durch die Kristallisation einer PAL aus *Petroselinum crispum* konnten Ritter und Schulz (2004) die dreidimensionale Struktur des Enzyms aus Pflanzen aufklären und beschreiben. Song und Wang zeigten 2008 durch Molecular Modelling mit SWISS MODEL, dass sich diese Struktur auf die Aminosäuresequenz der *Salvia miltiorrhiza*-PAL übertragen lässt. Die typische „Seepferd“-Form bestehend aus MIO-Domäne des aktiven Zentrums, core domain und inserted shield domain konnte auch an diesem Modell beobachtet werden. Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen den PAL-Sequenzen aus *Salvia miltiorrhiza* und *Melissa officinalis*, kann auch für die PAL aus *Melissa officinalis*-Suspensionskulturen von einer solchen Tertiärstruktur ausgegangen werden.

4.1.2 Charakterisierung der PAL

In den Kapiteln 3.2.1 und 3.4.6 sind die Ergebnisse der Charakterisierung der PAL im Proteinrohextrakt aus Suspensionskulturen von *Melissa officinalis* und des heterolog exprimierten Enzyms wiedergegeben. Tabelle 4 stellt die kinetischen Parameter des Enzyms, Temperaturoptimum, pH-Optimum und K_m -Wert für L-Phenylalanin übersichtlich dar. Sie erlaubt nicht nur den Vergleich zwischen nativem und rekombinantem Protein der Melisse, sondern auch mit Werten, die zuvor für PAL anderer Pflanzen ermittelt wurden.

Im Proteinrohextrakt der Melisse konnten nur pH- und Temperaturoptimum des Enzyms ermittelt werden. Die optimale Reaktionstemperatur liegt mit 50 °C etwa 15 °C unter dem Wert, der für das rekombinante Enzym bestimmt wurde. Dennoch korrelieren beide Werte gut mit den Temperaturoptima, die für die PAL anderer Pflanzen bestimmt wurden. Die große Differenz zwischen den beiden Werten kann durch die Anwe-

senheit weiterer im Rohextrakt enthaltener Isoformen des Enzyms bedingt oder durch andere im Proteinrohextrakt enthaltene Enzyme verfälscht sein.

Ein direkter Vergleich der pH-Optima ist nur eingeschränkt möglich, da von den verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Puffersysteme zur Charakterisierung des Enzyms gewählt worden waren. Dass die Aktivität eines Enzyms nicht nur durch den pH-Wert des Reaktionsansatzes, sondern auch durch das verwendete Puffersystem beeinflusst wird, ist an den Ergebnissen der Versuche zur Ermittlung des pH- und Pufferoptimums der PAL im Proteinrohextrakt aus *Melissa officinalis*-Suspensionskulturen erkennbar (Kap. 3.2.1.3). Dennoch ist es möglich, aus Tabelle 4 abzulesen, dass die PAL offensichtlich ein leicht basisches Milieu bevorzugt.

PAL aus (EMBL-Eintrag)	Temperatur- optimum	pH-Optimum	K _m für L-Phe	Quelle
<i>Melissa officinalis</i> RE aus Suspensionskul- turzellen	50 °C	7,85 in BBP 8,2 in KP 8,5 in Tris/HCl	n.b.	Kap. 3.2.1
<i>Melissa officinalis</i> rekombinantes Protein	65 °C	7,0-8,0 in BBP 8,0 in KP	47 µmol/l	Kap. 3.4.6
<i>Coleus blumei</i> RE aus Suspensionskul- turzellen	n.a.	7,8 in BBP	160 µmol/l	Petersen et al., 1994
<i>Salvia miltiorrhiza</i> (EF462460)	60 °C	8,7 in BBP	n.a.	Song und Wang, 2009
<i>Arabidopsis thaliana</i> (AY303128-303130)	46-48 °C	8,4-9,2 in Tris/HCl	64-71 µmol/l	Cochrane et al., 2004
<i>Petroselinum crispum</i> (P24481)	58 °C	8,5 in NaB	15-24,5 µmol/l	Appert et al., 1994
<i>Zea mays</i> (L77912)	55-60 °C	8,0-8,5 in NaB	270 µmol/l	Rösler et al., 1997

Tab 4: Enzymcharakteristika diverser PAL.

Um die Übersichtlichkeit der Tabelle zu gewährleisten, wurden folgende Abkürzungen verwendet: n.b.: nicht bestimmbar, n.a.: nicht angegeben, BBP: Borsäure/Borax-Puffer, KP: KH₂PO₄/K₂HPO₄-Puffer, NaB: Natriumborat-Puffer

Die Aktivität der PAL wird ferner durch die Anwesenheit von DTT beeinflusst. Dieses wurde dem Proteinrohextrakt in Konzentrationen von 1 mmol/l zugesetzt, weil es als Reduktionsmittel in der Lage ist, SH-Gruppen der Enzyme zu schützen und die Bildung von Disulfiden zu verhindern. Die Auswertung der Kristallisation einer PAL aus *Petroselinum crispum* zeigte, dass das nucleophile DTT am aktiven Zentrum der PAL, dem elektrophilen MIO, bindet. Weil der V_{max} der PAL durch DTT nicht verändert wird, handelt es sich um eine kompetitive Hemmung. Da nach mehrstündiger Inkubation der PAL in DTT-haltiger Lösung (0,5 mM) eine verstärkte Abnahme der Enzymaktivität beobachtet werden konnte, schlossen Ritter und Schulz (2004), dass es sich bei der Bindung des

DTT an das MIO in kurzen Zeiträumen zunächst um eine reversible kompetitive Hemmung handeln muss, die nach mehreren Stunden durch die Oxidation der Substanz in eine irreversible Hemmung übergeht. Das Proteinrohextrakt aus Melissen-Suspensionskulturen wurde stets in verschlossenen Reaktionsgefäßen auf Eis aufbewahrt oder bei -20 °C gelagert. Eine Abnahme der PAL-Aktivität bei Alterung des Rohextrakts konnte während der Verwendung des Rohextrakts zur Bestimmung von Enzymcharakteristika nicht beobachtet werden.

Die Bestimmung des apparenten K_m -Wertes für L-Phenylalanin war im Proteinrohextrakt aus Suspensionskulturen von *Melissa officinalis* nicht möglich. Grund hierfür könnte einerseits die insgesamt geringe PAL-Aktivität des Proteinrohextraktes an allen Kulturtagen sein, aber auch die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer Isoformen mit unterschiedlichen Parametern, die die Messung beeinflussten.

Neben L-Phenylalanin akzeptieren die meisten PAL auch L-Tyrosin als Substrat (MacDonald und D'Cunha, 2007). Während die PAL zweikeimblättriger Pflanzen in der Regel hochspezifisch für L-Phenylalanin sind, setzt das gleiche Enzym in manchen photosynthetisch aktiven Bakterien L-Tyrosin mit höherer Spezifität um. Das Reaktionsprodukt, die 4-Hydroxymzimtsäure, wird von diesen Bakterien als Chromophor für das photoaktive gelbe Protein benötigt (Kyndt et al., 2002). Bezüglich ihrer Fähigkeit L-Tyrosin zu desaminieren, wurde die PAL der Melisse bislang weder im Proteinrohextrakt noch als heterolog exprimiertes Enzym untersucht.

4.1.3 Auftreten von PAL-Genkopien

In allen bislang näher untersuchten Pflanzen wird die PAL durch kleine Familien von 2 bis 4 Genen codiert. Eine Ausnahme stellt die Kartoffel (*Solanum tuberosum*, Solanaceae) dar, in der Joos und Hahlbrock (1992) etwa 40 bis 50 PAL-Gene, bezogen auf das haploide Genom, nachweisen konnten. Eine weitere Pflanze mit auffällig vielen Genkopien ist die Tomate (*Solanum lycopersicum*), die ebenfalls zur Familie der Nachtschattengewächse zählt und über 26 Genkopien enthält (Lee et al., 1992). Die in Kapitel 3.3.8 beschriebenen Ergebnisse der Southern Blot-Analyse weisen auf die Anwesenheit zweier PAL-Kopien im Genom der Melisse hin. Da lediglich eine dieser beiden Sequenzen isoliert und aufgeklärt werden konnte, kann derzeit keine Aussage darüber gemacht werden, ob die beiden PAL-Gene derselben Klasse oder zwei unterschiedlichen Klassen zugeordnet werden müssen, wie es beispielsweise bei den PAL-Genen aus *Rubus idaeus* der Fall ist (Kumar und Ellis, 2001).

Tabelle 5 gibt einen kleinen Überblick über die Zahl der PAL-Isoformen und, sofern bekannt, Klassen im Genom verschiedener Pflanzen. Auch wenn die Zahl der Genkopien mit lediglich zwei im Genom der Melisse eher gering ist, verdeutlicht die Tabelle, dass dies dennoch eine durchaus realistische Zahl sein kann. Auch in *Salvia miltiorrhiza*, einer weiteren Lamiacee, wurden nur zwei PAL-Genkopien berichtet (Song und Wang, 2009). Die Anwesenheit weiterer Isoformen kann trotz sorgfältiger Durchführung und Interpretation des Southern Blotting selbstverständlich nicht komplett ausgeschlossen werden.

Pflanze	Zahl der Isoformen	Quelle
<i>Melissa officinalis</i>	2	Kapitel 3.3.8
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	2	Song und Wang, 2009
<i>Solanum lycopersicum</i>	26; 5 Klassen	Lee et al., 1992
<i>Solanum tuberosum</i>	> 40; min. 12 Klassen	Joos und Hahlbrock, 1992
<i>Petroselinum crispum</i>	4; 3 Klassen	Appert et al., 1994
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4; 2 Klassen	Cochrane et al., 2004
<i>Rubus idaeus</i>	2; 2 Klassen	Kumar und Ellis, 2001
<i>Phaseolus vulgaris</i>	14; 3 Klassen	Cramer et al., 1989
<i>Ginkgo biloba</i>	2	Xu et al., 2008
<i>Ephedra sinica</i>	4; 1 Klasse	Okada et al., 2008

Tab. 5: Zahl der PAL-Isoformen und Klassen im Genom verschiedener Pflanzen

4.1.4 Genomische Sequenz der PAL

Die genomische Sequenz der PAL konnte durch PCR mit Vollängen-Primern für die PAL-cDNA der Melisse amplifiziert und schließlich sequenziert werden. Wie die PAL-Gensequenzen vieler weiterer Angiospermen verfügt sie über zwei Exons, das kürzere am 5'-Terminus der Sequenz, und ein Intron. Die Lage des Introns, nicht aber seine Sequenz, ist hoch konserviert (Cramer et al., 1989; Wanner et al., 1995; Lee et al., 1992; Joos und Hahlbrock, 1992) und beginnt in den meisten Fällen im Codon eines Arginins (Abb. 106). Selbst in den PAL-Gensequenzen der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und der Orchidee *Bromheadia finlaysoniana*, in denen das Arginin durch ein Lysin ersetzt wurde, bleibt die Position des Introns konserviert (Kumar und Ellis, 2001). Ausnahmen sind *Atpal3* und *Atpal4*, zwei PAL-DNA-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, die neben dem Intron, welches konserviert auch hier in der Nukleotidsequenz für Arginin beginnt, zusätzlich über ein weiteres Intron verfügen (Cochrane et al., 2004). Die Größe der Intronsequenz variiert zwischen 90 bp in Erbse (*Pisum sativum*) und ungefähr 1900 bp in einer PAL aus *Nicotiana tabacum* (Kumar und Ellis, 2001) und beträgt bei Melisse 836 bp. 2008 wurde die genomische DNA einer *Ginkgo biloba*-PAL kloniert (Xu et al., 2008). Da weder dieses Gen noch das PAL-Gen aus *Pinus taeda* (EMBL-Eintrag: PTU39792), einer weiteren Gymnosperme, über ein Intron verfügen, vermutet die Arbeitsgruppe um Xu, dass das Intron lediglich in den PAL-Genen der Angiospermen, nicht aber in den genomischen Sequenzen der Gymnospermen konserviert ist und eventuell in sämtlichen PAL-Genen von Nacktsamern fehlen könnte. Diese Aussage konnte bislang weder näher belegt noch entkräftet werden.

In den Organismen der Säugetiere, Insekten und Nematoden üben Introns vielfach einen positiven Effekt auf die Expression eines Gens aus. In Pflanzen sind Intron-haltige Genkonstrukte gewöhnlich für eine verstärkte mRNA- und Proteinakkumulation verantwortlich. Ein Effekt, den man als „Intron-mediated enhancement of gene expression“

(IME), etwa Intron-vermittelte Verstärkung der Genexpression, bezeichnet. Er tritt in Monokotylen stärker als in Dikotylen auf und kann die Genexpression um mehr als den Faktor 100 steigern. In Pflanzen soll die mRNA-Zunahme posttranskriptional etwa durch Förderung der mRNA-Reifung oder Stabilisierung des neugebildeten Transkriptes verstärkt werden (Rose und Beliakoff, 2000).

Insbesondere im Bereich nicht-codierender Sequenzen und innerhalb der Introns können große Unterschiede zwischen den PAL-Genen beobachtet werden. Diese sind einerseits ein Nachweis für die unterschiedliche Regulation der PAL auf Genebene, können andererseits jedoch auch früh evolutionär bedingt sein und damit in Zusammenhang mit den unterschiedlichen biologischen Funktionen des Produktes *t*-Zimtsäure stehen (Cramer et al., 1989). Die große Variabilität der Intronsequenzen führt man auch auf den geringeren Selektionsdruck zurück, da diese Bereiche nicht mehr im funktionellen Protein auftauchen. Deswegen hat man diese Sequenzen auch als molekulare Uhr für evolutionäre Datierungen verwendet.

4.1.5 Expression der PAL

Die PAL, das erste Enzym des Phenylpropanoidstoffwechsels, ist ein Schlüsselenzym zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus. Wie die übrigen Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels kann es induziert werden, um vermehrt Ausgangsstoffe für die Bildung solcher Sekundärprodukte zur Verfügung zu stellen, die die Pflanze in Stresssituationen benötigt. Die erforderlichen Änderungen der PAL-Aktivität sollen auf dem Transkriptionslevel reguliert sein (Joos und Hahlbrock, 1992). Ob das Auftreten multiplexer Gene auch dem Zweck der vermehrten Produktbildung nach Induktion dient oder der Organisation unterschiedlicher Enzymformen in verschiedenen metabolischen Kompartimenten Rechnung trägt (Dixon und Paiva, 1995), konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

Funktion und Expression der einzelnen PAL-Isoformen variieren stark in den untersuchten Pflanzen. Beispiele sind die Himbeere und die Tomate. Während in der Himbeere (*Rubus idaeus*) die Expression beider Isoformen nachgewiesen und sogar die Aufgaben der jeweiligen Isoform geklärt werden konnten (Kumar und Ellis, 2001), ist es unklar, wieso von den mehr als 25 PAL-Isoformen der Tomate (*Solanum lycopersicum*) selbst in Stresssituationen vorrangig lediglich eine einzige Form exprimiert wird (Chang et al., 2008).

Ob ausschließlich eine oder beide Genkopien des Enzyms in *Melissa officinalis*-Suspensionskulturen transkribiert werden, könnte entweder durch Northern Blotting oder Expressionsstudien untersucht werden. Expressionsstudien setzen allerdings voraus, dass zumindest eine charakteristische Teilsequenz für jedes Gens bekannt ist.

Die PAL-Isoformen aus *Petroselinum crispum* besitzen annähernd ununterscheidbare katalytische Eigenschaften, dennoch werden alle vier, in unterschiedlichem Ausmaß, in allen großen Pflanzenorganen exprimiert (Appert et al., 1994). Über die Gründe wird spekuliert. Die PAL ist ein Tetramer, das aus identischen Untereinheiten aufgebaut ist (Appert et al., 1994). Werden, ausgelöst durch äußere Stimuli, verschiedene Gene trans-

kribiert und gegebenenfalls zusätzlich posttranslational modifiziert, so können tetramere Isoformen gebildet werden, die sich nicht nur in ihrem Aufbau, sondern möglicherweise auch in ihrer Funktion unterscheiden (Liang et al., 1989). Außerdem können die PAL-Isoformen zur Bildung diverser Multienzymkomplexe beitragen. In diesen Komplexen sollen Enzyme aus verschiedenen Zweigen des Phenylpropanstoffwechsels über Protein/Protein-Assoziationsdomänen miteinander konjugiert sein (Appert et al., 1994).

Eine Verbindung zwischen Genduplikation, der Regulation der Proteinaktivität und den Charakteristika der Isoformen stellen Kumar und Ellis (2001) in Bezug auf die PAL verschiedener untersuchter Pflanzen dar. Sofern die Genduplikation der PAL nach der Differenzierung der Mono- und Dikotyledonen stattfand, resultierten innerhalb einer Spezies Genkopien, die enger untereinander verwandt sind als zu PAL-Genen anderer Spezies. Dies drückt sich am Beispiel der Petersilie nicht nur in den zuvor erwähnten übereinstimmenden Enzymcharakteristika der PAL-Isoformen aus, sondern auch in den beachtlichen Sequenzähnlichkeiten der Promotorelemente und der gemeinsamen Expression. Weitere Beispiele solcher später Genduplikationen sind PAL-Genkopien aus *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* und *Solanum lycopersicum*. Anders bei der Bohne (*Phaseolus vulgaris*) und der Himbeere (*Rubus idaeus*). Die in diesen Pflanzen exprimierten PAL-Isoformen werden, wie die PAL der Bohne, durch unterschiedliche Stimuli induziert (Liang et al., 1989) oder in einem Organ, zum Beispiel dem Fruchtstand der Himbeere, in Abhängigkeit unterschiedlicher Entwicklungsstadien exprimiert (Kumar und Ellis, 2001).

Die Expression des klonierten PAL-Gens aus *Melissa officinalis* konnte durch semiquantitative PCR im Kulturverlauf nachgewiesen werden. Da die mRNA-Expressionslevel im Verlauf der Charakterisierung nicht nur gut mit der ermittelten Aktivität und spezifischen Aktivität der PAL im Proteinrohextrakt aus Suspensionskulturzellen sondern auch mit der Rosmarinsäure-Akkumulation korrelieren (Kap. 3.1.4.5), scheint es sich bei der heterolog exprimierten PAL tatsächlich um die Isoform zu handeln, die an der Rosmarinsäure-Biosynthese beteiligt ist.

Dass die Rosmarinsäureakkumulation nach Elicitierung einer Suspensionskultur mit Methyljasmonat deutlich gesteigert werden kann, konnte in Kapitel 3.1.3 gezeigt werden. Welchen Einfluss die Elicitierung auf die PAL-Aktivität im Proteinrohextrakt aus Melissen-Suspensionskulturen ausübt und welche der beiden PAL-Isoformen gegebenenfalls induziert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden.

4.2. Zimtsäure 4-Hydroxylase

Die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) zählt zu den Cytochrom P450-Enzymen. Zur Charakterisierung dieses membrangebundenen Enzyms wurde, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, die Mikrosomen-Fraktion (MS) isoliert und zur Bestimmung der Enzymcharakteristika herangezogen.

Temperaturoptimum, pH-Optimum und K_m -Werte für die Substrate *t*-Zimtsäure und NADPH korrelieren mit den Werten, die zuvor für das Enzym aus Pflanzen wie *Coleus blumei* (Petersen et al., 1994), *Anthoceros agrestis* (Petersen, 2003), *Ammi majus* (Hübner et al., 2003) und *Petroselinum crispum* (Koopmann et al., 1999) ermittelt werden konnten (Tab. 6).

C4H aus (EMBL-Eintrag)	Temperatur- optimum	pH- Optimum	K_m für <i>t</i> -Zimtsäure	K_m für NADPH	Quelle
<i>Melissa officinalis</i> MS aus Suspensionskul- turzellen	35 °C	7,0-7,5 in Tris/HCl 7,5 in KP	9 µmol/l	27 µmol/l	Kap. 3.2.2
<i>Coleus blumei</i> MS aus Suspensionskul- turzellen	n.a.	7,5 in Tris/HCl	35 µmol/l	40 µmol/l	Petersen et al., 1994
<i>Anthoceros agrestis</i> MS aus Suspensionskul- turzellen	25 °C	7,0 in Tris/HCl	5 µmol/l	60 µmol/l	Petersen, 2003
<i>Ammi majus</i> (AY219918)	25 °C	7,0 in Tris/HCl 6,5 in KP	8,9 µmol/l	n.a.	Hübner et al., 2003
<i>Petroselinum crispum</i> (AAC41660)	n.a.	7,0 in KP	5 µmol/l	n.a.	Koopmann et al., 1999

Tab. 6: Enzymcharakteristika diverser C4H

Um die Übersichtlichkeit der Tabelle zu gewährleisten wurden folgende Abkürzungen verwendet:
n.a.: nicht angegeben, KP: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, NaB: Natriumborat-Puffer

4.3 Hydroxyzimtsäure:Coenzym A-Ligase

4.3.1 cDNA-Vollängensequenz

Die Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL) ist das dritte und letzte Enzym des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechselwegs. Sie katalysiert die Aktivierung der Zimtsäuren mit Coenzym A in einer ATP-abhängigen Reaktion. Nur die aktivierten CoA-Ester werden im nächsten Schritt der Rosmarinsäure-Biosynthese von der Rosmarinsäure Synthase mit dem Produkt der HPPR verestert.

Aus Melissen-cDNA konnte eine 4CL kloniert und nach Expression in Bakterien charakterisiert werden (Kap. 3.4). Das vollständige offene Leseraster besteht aus 1620 Basenpaaren, die ein Protein von 540 Aminosäuren codieren, welches hohe Sequenzähnlichkeit zu anderen 4CL zeigt. Die höchsten Identitäten bestehen auf Nucleotidebene zu den 4CL-Sequenzen aus *Salvia miltiorrhiza* (EMBL-Eintrag: AY237164) (88 %) (Zhao et al., 2006), *Paulownia fortunei* (EMBL-Eintrag: FJ230968) (85 %) (Pei et al., unveröffentlicht) und *Scutellaria baicalensis* (EMBL-Einträge: AB166768 und AB166767) (jeweils 81 %) (Nagashima et al., unveröffentlicht).

Die 4CL zählt zur Gruppe der Acyladenylat-bildenden Enzyme, die neben dem gemeinsamen Reaktionsmechanismus (Kap. 1.2.6) auch eine gemeinsame Peptidsequenz aufweisen (Fulda et al., 1993), die als Box I bezeichnet wird: SSGTTGLPKG_V. Abbildung 143, ein Sequenzvergleich verschiedener Acyladenylat-bildender Enzyme, zeigt, dass dieses Motiv zwar nicht hoch konserviert ist, aber auch in den Luciferasen, beispielsweise aus dem Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) (EMBL-Eintrag: Q27758) und einer Acetyl:CoA-Ligase aus *Saccharomyces cerevisiae* (EMBL-Eintrag: P30624) zu finden ist. Diese mögliche AMP-Bindedomäne des Enzyms enthält an ihrem C-Terminus ein hoch konserviertes Lysin. Eine ähnliche Struktur, das Walker A-Motiv GXXXXGK(ST), findet sich auch in vielen ATP- oder GTP-bindenden Proteinen, wo es die sogenannte Phosphat-Bindeschleife formt. In dieser Schleife interagiert die Aminosäure Lysin mit Phosphatresten. Stuible und seine Mitarbeiter (2000) folgerten, dass eine Mutation dieser Aminosäure nicht nur Einfluss auf die Aktivität des Enzyms, sondern auch auf den K_m -Wert für ATP haben sollte. Tatsächlich führte der Austausch des Lysins durch ein Serin zu einer starken Abnahme der Enzymaktivität, hatte jedoch keinen Einfluss auf den K_m -Wert und die Bindung des ATP. Durch die Kristallisation der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit (PheA) der Gramicidin-Synthetase 1 konnte gezeigt werden, dass das Box I-Motiv eine flexible Schleife bildet, die zwar der freiwerdenden Phosphatgruppe Platz bietet, aber nicht direkt an der ATP-Bindung beteiligt ist (Conti et al., 1997).

Das zweite konservierte Motiv, die sogenannte Box II, GEICIRG, tritt hoch konserviert in allen 4CL auf (Stuible et al., 2000). Zu den wenigen Ausnahmen zählen eine 4CL-Genkopie in *Rubus idaeus* (Ri4CL3, EMBL-Eintrag: AF239685), die 4CL3 aus *Lolium perenne* (EMBL-Eintrag: AF052223) und eine 4CL-Isoform aus *Arabidopsis thaliana* (At4CL4, EMBL-Eintrag: AY376731), in denen ein Isoleucin durch Valin ersetzt ist: GEICVRG (Kumar und Ellis, 2003). Das zentrale Cystein dieses Motiv ist nicht, wie lange angenommen wurde, direkt am Reaktionsmechanismus beteiligt, sondern übt einen stabilisierenden oder unterstützenden Effekt aus.

In allen Acyladenylat-bildenden Enzymen ist ein konserviertes Arginin zu finden, das in Abbildung 143 hervorgehoben wurde. Die Kristallisation der Gramicidin-Synthetase 1 (PheA) zeigte, dass jenes Arginin mit dem Lysin des Box I-Motivs die Freisetzung des Phosphatrestes während der Bildung des Adenylates koordiniert.

Von den beiden Lysin-Resten in unmittelbarer Nachbarschaft des konservierten Arginins, ist Lys⁴³⁵ der 4CL der Melisse konserviert in allen 4CL- und Luciferase-Sequenzen zu finden, Lys⁴³⁷ tritt sogar hoch konserviert in allen Acyladenylat-bildenden Enzymen auf. Wie Mutationsexperimente zeigen konnten, spielt letzteres eine wichtige Rolle bei der Koordinierung des Reaktionsablaufs und der Freisetzung des Produktes.

Ein drittes hoch konserviertes Lysin (Abb. 143, Position 526 der Melissen-Sequenz) stabilisiert den negativ geladenen pentavalenten Übergangszustand und kann als das aktive Zentrum der Adenylatbildung betrachtet werden (Stuible et al., 2000). Dies konnte ebenfalls durch Kristallisation der PheA gezeigt werden (Conti et al., 1997).

Diskussion

Mo4CL	-----MENPAGQEE----IIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISKFS---	39
Gm4CL2	-----MADDGSRR-----LIIFRSKLPDIYIPKHMPLHSYCFENLRECG---	39
At4CL4	-MVLQQQTHFLTKKIDQEDEEEEP SHDFIIFRSKLPDIFIPNHLPLTDYVQRFSGDGDGD	59
Luciferase	-----MEDAKNIKK-----GPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALV	36
Acyl:CoA-L	MVAQYTPVPGKAANEHETAPRRNYQCREKPLVRPNTKCSVTYEFVLECFQKNKNSNAMG	60

Mo4CL	-TRPCLINGATGDVYT-----YEEVELTARKVATGLSQLG	73
Gm4CL2	-SRPCLINAPTGDVYS-----YHEVDSTARKVARGLKKEG	73
At4CL4	SSTTCIIDGATGRILT-----YADVQTNMRIAAGIHRLG	94
Luciferase	PGTIAFTDAHIEVNIT-----YAEIFEMSVRLAEAMKRYG	71
Acyl:CoA-L	WRDVKEIHESKSVMKKVDGKETSVEKKWMYELSHYHNSFDQLTDMHEIGRLVKIG	120
	. . . : . . . : *	

Mo4CL	IQQGE--TIMLLLPSPEYVFAFLGASYIGAVSTMNPPFFAPAEVIKQAKASAAKLIITQ	131
Gm4CL2	VEQGQ--VIMILLPNCPEFVFSFLGASHRGAMATAANPFFTPAEIAKQAHASNAKLLITQ	131
At4CL4	IRHGD--VVMLLLPSPEFALSFLAVAYLGAVSTTANPFYTQPEIAKQAKASAAKMIITK	152
Luciferase	LNTNH--RIVQSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLSNMNISQPTVVFVS	129
Acyl:CoA-L	LKPNDDDLHLHYAATSHKKWMMKMFALGASQGIPIVVTAYDTLGEKGLIHSLVQTGSAIFTD	180
 : * . . * . *	

Mo4CL	ACYVDKVGDIYASDNGVKVMCIDAP-----PPG-----CLPF	162
Gm4CL2	ASYDVKVDLR---DIKLVFVDSC-----PPHTEEKQHLHF	164
At4CL4	KCLVDKLTNLKND-GVLIVCLDDDGNG-----VVSSDDGCVSF	191
Luciferase	KKGLQKILNVQKKLPITIKIIIMDSKTD-----YQGFSMYTFVT	169
Acy1:CoA-L	NSLLPSLIKPVQAAQDVKYIIHFDSISSEDRRQSGKIYQSAHDAINRIKEVRPDIKTFSF	240

Mo4CL	SELT--SADERDMPAVKIH-PEDAVALPY	SSGTTGLPKGV MLTHKGLVTSVAQQVDGENP	219
Gm4CL2	SHLCEDNGDADVDVDVDIK-PDDVVALPY	SSGTTGLPKGV MLSHKGLVTSIAQQVDGDNP	223
At4CL4	TELT--QADETELLKPKIS-PEDTVAMPY	SSGTTGLPKGV MITHKGLVTSIAQKVDGENP	248
Luciferase	SHLPPGPFNEYDFVPESFDR-DKTIALIMN	SSGTSGPSKGV ALPHRTACVRFSSHARDPIFG	228
Acyl:CoA-L	DDLILKLGKESCNEIDVHPPGKDLDCCIMY	TSGSTGEKGV LPVLKSHNVVAGVGAS--LNV	298
	. : . :	*** ** * :	. . .

Box I-Motiv: putative AMP-Bindedomäne

Mo4CL	NLYIHSESDVMLCVLPLFHH IYSLNS VLLCGLRVG-----AAILIMQKFDIVPFLELMQKYKV	275
Gm4CL2	NLYYHCHDTILCVLPLFHH IYSLNS VLLCGLRAK-----ATILLMPKFIDINSLALIHKKHV	279
At4CL4	NLNFTANDVILCF LPMFH IYALD ALMLSAMRTG----AALLIVPRFELNLVMELIQRVKV	304
Luciferase	NQIIP-DTAILSVVPFHGHGFMTTLG-YLICG----FRVVLMYRFEELFLRSLQDYKI	282
Acy1:CoA-L	LKFVGNTDRVICFLPLAHIFELVELLSFYWGACIGYATVKTLTSSSRVNCQGDLQEFPK	358
	: : : * : * : : : : : : : : : . : : *	

Aminosäuren der Substrat-Bindetasche

Mo4CL	TIG P FVPSIVLAIAKSPL-----VGKYDISSVRMA M S G AAPLG----KE	315
Gm4CL2	TIA P VVPPIVLAIKSPD-----LHKYDLSSIRVL K S G GAPLG----KE	319
At4CL4	TVV P VAPPVVLAFIKSPE-----TERYDLSSVRIM L S G AATLK----KE	344
Luciferase	QSALLVPTLFSSFPAKSTL-----IDKYDLNLSHIEASGGAPLS----KE	322
Acyl:CoA-L	TIMGVAAVWETVRKGILNQIDNLFFLTKKIFWTAYNTKLNMQLRHIPGGGAGLNLFVKK	418
	. . . : * : . . . : . : * . . . * *	

[illegible]

Mo4CL	KSGACGTVVRNAEVKIVDPETGASLGRNQSGEICIRGDQIMKGYLNDLESTKRTIDHDGW	415
Gm4CL2	KPGACGTVVRNAEMKIVDPETGHS LPRNQSGEICIRGDQIMKGYLNDGEATERTIDKDGW	419
At4CL4	KSGACGTVIRNAEMKVVD TETGIS LPRNKS GEICVRGHQLMKGYLNDPEATARTIDKDGW	443
Luciferase	KPGAVGKVVPFFFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVNDPEATNALIDKDGW	417
Acyl:CoA-L	ELVGAGDLTGCVTVKLVLDVEELGYFAKNNGQSEVWITGANVTPPEYKYNEEETSQALTS DGW	533
	* * * * : * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * *	

Box II-Motiv

Mo4CL	LHTGDIGFIDADDELFIVDRLKEIIK-YKGFQVAPAEIEALLSHPYISDAAVVSMQDE-	473
Gm4CL2	LHTGDIGYIDDDDELFIVDRLKELIK-YKGFQVAPAELEALLTHPKISDAAVVPMKDE-	477
At4CL4	LHTGDIGFVDDDEIFIVDRKELIK-FKGYQVAPAELEALLSHPSIDDAAVVAMKDE-	501
Luciferase	LHSGDIAYWDEDEHFFIVDRKSLIK-YKGCQVAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPGD-	475
Acyl:CoA-L	FKTGDIGEWANGHLKIIDRKKNLVKTMNGEYIALEKLESVYRSNEYVANICVYADQSKT	593
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> :::***. : : .: *:* *::: * : * :*: : : * konserviertes Arginin Lysin^{435 + 437} </div>	
Mo4CL	-----QAGEVPVAFVVRNNGST-----ITEDEIKQFISKQVVF	506
Gm4CL2	-----AAGEVPVAFVVISNGYTD-----TTEDEIKQFISKQVVF	511
At4CL4	-----VADEVPAFVARSQGSQ-----LTEDDVKS YV NKQVVH	534
Luciferase	-----DAGELPAAVVLEHGKT-----MTEKEIVDYVASQVTT	508
Acyl:CoA-L	KPVGIIVPNHAPLTKLAKKLGIMEQKDSSINIENYLEDAKLIKAVYSDLLKTGKDQGLVG	653
	... * : . . *	
Mo4CL	YKRIN-RVFFIDAIPK-----SPSGKILRKDLRSRLAAAV-----	540
Gm4CL2	YKRIN-RVFFIDAIPK-----SPSGKILRKDLRAKIAASVPK-----	547
At4CL4	YKRIK-MVFFIEVIPK-----AVSGKILRKDLRAKLETMCSK-----	570
Luciferase	AKKLRGGVVVFDEVVPK-----GLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL	550
Acyl:CoA-L	IELLAGIVFFDGEWTPQNGFVTSAQKLRKDIINAVKDKVDVAVSSS	700
	: : *. * . : * : : : :	
	hochkonserviertes Lysin⁵²⁶ aktives Zentrum der Adenylat-Bildung	

Abb. 143: Sequenzvergleich Acyladenylat-bildender Enzyme: 4CL aus *Melissa officinalis*, 4CL 2 aus *Glycine max*, 4CL 4 aus *Arabidopsis thaliana*, Luciferase aus *Photina pyralis* und Acyl:CoA-Ligase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Markiert sind verschiedene konservierte Aminosäuren und Regionen (Stuible et al., 2000) sowie die 12 Aminosäuren, die an der Bildung der Substrat-Bindetasche beteiligt sein sollen (Schneider et al., 2003). Sofern angegeben, bezieht sich die Bezeichnung der Aminosäureposition auf die *Melissa officinalis* 4CL-Proteinsequenz.

4.3.2 Genomische Struktur der 4CL und Interpretation der Ergebnisse des Southern Blotting

Durch die in Kapitel 2.5.10 beschriebene Methode konnte die genomische Sequenz einer 4CL aus *Melissa officinalis* aufgeklärt werden. Diese entspricht exakt der cDNA-Vollängensequenz des Enzyms, das heißt, sie ist auch frei von Introns. Dies ist insofern ungewöhnlich, als die meisten genomischen Sequenzen der 4CL, die bislang aus ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen isoliert wurden, über 3 und mehr Introns verfügen, die häufig weder in ihrer Lage noch in ihrer Sequenz konserviert sind (Lindermayr et al., 2002). Selbst innerhalb einer Spezies können 4CL-Gene mit unterschiedlichen Intron-Zahlen auftreten. Ein Beispiel ist *Arabidopsis thaliana*. Im Genom dieser Art konnten 4 Genkopien der 4CL identifiziert werden. Drei von diesen (At4CL1, At4CL2 und At4CL4) verfügen über jeweils drei Introns, die in ihrer Position konserviert sind, sich aber in Länge und Sequenz deutlich voneinander unterscheiden. At4CL3 enthält außerdem drei zusätzliche Introns (Ehlting et al., 1999). Von den bekannten 4CL-Genen sind die drei Genkopien der Himbeere (*Rubus idaeus*) bislang die einzigen, die intronfrei sind (Kumar und Ellis, 2003). Einerseits kann aufgrund dieser Beobachtungen davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Sequenz, die mit cDNA-Vollängenprimern aus genomischer Melissen-DNA amplifiziert wurde, tatsächlich um die genomische Sequenz einer 4CL handelt. Andererseits schließt die Aufklärung einer intronfreien Gensequenz nicht das gleichzeitige Vorhandensein weiterer intronhaltiger 4CL-Gene aus.

Der Versuch, alle 4CL-Genkopien oder –Isoformen einer Spezies aufzuspüren, erwies sich in der Vergangenheit sowohl mit PCR-gestützten Methoden als auch mit DNA- oder cDNA-Banken als Schwierigkeit. Die Ursachen waren vielfältig. Wird mRNA als Template verwendet, wie es bei der RT-PCR und der cDNA-Bank der Fall ist, besteht die Gefahr, dass zum Zeitpunkt der mRNA-Isolierung nicht alle gesuchten 4CL-Genkopien transkribiert wurden, da die Expression der einzelnen Genkopien von Gewebe, Entwicklungszustand und äußeren Reizen abhängig ist. Eine Arbeitsgruppe um Zhao (2006) schreibt, dass eine Identifizierung der 4CL-Isoformen durch RT-PCR mit degenerierten Primern in *Salvia miltiorrhiza*-Blättern ohne Ergebnis blieb, da vermutlich zu wenig Transkript vorhanden war. Kumar und Ellis (2003) beobachteten, dass selbst in scheinbar konservierten Bereichen Sequenzvariationen in einzelnen Genen auftreten können. In solchen Fällen werden selbst mit degenerierten Primern nicht alle 4CL-Gensequenzen amplifiziert. Ein Beispiel ist die Pappel, aus der Cukovic und Mitarbeiter (2001) drei neue 4CL-Gene isolieren konnten, die Amplifikation eines bereits bekannten Gens jedoch scheiterte. Der Nachweis von Genkopien durch Southern Blotting oder das Screening von DNA-Banken setzen die Wahl einer sinnvollen Sonde voraus.

Mithilfe des Southern Blotting sollte die Zahl der 4CL-Genkopien im Genom der Melisse aufgeklärt werden (Kap. 3.4.6). Entscheidend für die Interpretation des Southern Blot ist die genomische Sequenz des Enzyms. Das in Kapitel 3.4.6.2 dargestellte Ergebnis weist auf das Vorhandensein von mindestens zwei Genkopien hin, da in den Spuren der mit *Bam*HI, *Eco*RI und *Mlu*I verdauten DNA jeweils zwei Banden zu sehen sind. Die dritte Bande in den *Bgl*II- und *Hind*III-Spuren könnte entweder auf eine weitere Genkopie hinweisen, die in den anderen Spuren nicht sichtbar wurde, oder aber durch eine Schnittstelle in der Sequenz der zweiten Genkopie, möglicherweise auch innerhalb eines Introns dieser Genkopie, bedingt sein. Alle zuvor erwähnten Enzyme schneiden nicht innerhalb der bekannten 4CL-Sequenz. Einmal schneidet das Restriktionsenzym *Bcl*II. Die vier Banden in der entsprechenden Spur erhärten die Annahme, dass zwei 4CL-Genkopien im Genom der Melisse vorliegen. Schwieriger ist die Interpretation der Ergebnisse der *Nde*I-Spur. Obwohl dieses Enzym nicht in der bekannten 4CL-Sequenz schneidet, können bis zu vier Banden gezählt werden.

Die zur Southern Blot-Analyse verwendete DIG-markierte Sonde umfasst eine Sequenz von 625 bp im Mittelteil der 4CL-cDNA. Dies entspricht dem Bereich zwischen den Aminosäuren Valin²¹⁰ und Glycin⁴¹⁴ der Proteinsequenz, in welcher das Box II-Motiv zu finden ist. Eine Wiederholung des Southern Blot zur Verifizierung der Ergebnisse mit einer Sonde, die die Nukleotidsequenz des hochkonservierten Box I-Motivs einschließt, wäre denkbar. Es ist bei der Auswertung jedoch darauf zu achten, dass das Box I-Motiv anders als das Box II-Motiv konserviert in allen Acyladenylat-bildenden Enzymen auftritt, so dass zusätzlich zu den 4CL-Genkopien auch Gene anderer Enzyme dieser Superfamilie detektiert werden könnten.

4.3.3 Expression der 4CL

4CL-Gene können auf Transkriptionsebene reguliert werden. Die Aktivierung oder Regulierung der Genexpression erfolgt sowohl im Verlauf der Entwicklung als auch durch Infektion mit Pathogenen, durch Elicitierung oder äußere Stimuli (Kumar und Ellis, 2003). Dies wurde an Zellkulturen der Sojabohne (*Glycine max*) gezeigt. Von den vier Isoenzymen werden zwei nach Elicitierung vermehrt exprimiert, die dritte weniger exprimiert und die letzte in ihrer Expression überhaupt nicht beeinflusst (Lindermayr et al., 2002).

Die Expression der 4CL korreliert in hohem Grade mit den Expressionen der Enzyme PAL und C4H. Ursächlich hierfür könnten Sequenzen hoher Ähnlichkeit im Bereich der Promotoren sein (Logemann et al., 1995). Im Falle der Melisse sind diese Sequenzen unbekannt, da die RACE-PCR auf einem mRNA-Template basiert und die genomischen Sequenzen der Enzyme PAL und 4CL mithilfe der cDNA-Volllängenprimer amplifiziert wurden.

Die Expressionslevel dieser 4CL-cDNA aus Melisse wurde über einen Zeitraum von 11 Tagen in Suspensionszellen von *Melissa officinalis* beobachtet, die in CB2-Medium kultiviert worden waren. Aus Abbildung 50 in Kapitel 3.1.4.6 geht hervor, dass die höchsten Expressionslevel an Tag 3 und Tag 5 erreicht werden. Der deutlich erkennbare Anstieg der Expression zwischen dem 6. und 11. Kulturtag spiegelt sich in der Zunahme der 4CL-Aktivität und spezifischen Aktivität zum Ende der Charakterisierung wider. Insofern korreliert die 4CL-Aktivität sowohl mit der Rosmarinsäure-Akkumulation als auch mit der PAL-Aktivität, die ebenfalls ein Maximum am 3. Kulturtag aufweist. Zusätzliche Hinweise, ob es sich bei dieser 4CL-cDNA tatsächlich um diejenige Isoform handelt, die maßgeblich an der Biosynthese der Rosmarinsäure beteiligt ist, könnten durch Beobachtung der mRNA-Expressionslevel in elicitierten Kulturen oder Kulturen, die in CB4-Medium kultiviert wurden, gewonnen werden.

4.3.4 Substratspezifität der 4CL

Die 4CL tritt in höheren Pflanzen gewöhnlich in einer Genfamilie mit zwei bis vier Mitgliedern auf (Zhao et al., 2006). Innerhalb einer Spezies können die 4CL-Isoformen hinsichtlich ihrer Struktur, ihrer katalytischen Eigenschaft und ihres Expressionsprofils nahezu identisch sein, wie es in Petersilie (Lozoya et al., 1988), Kartoffel (Becker-André et al., 1991) oder Kiefer (Zhang und Chiang, 1997) der Fall ist. Im Gegensatz dazu verfügen die 4CL-Isoformen der Himbeere (Kumar und Ellis, 2003), der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) (Ehlting et al., 1999; Hamberger und Hahlbrock, 2004) oder der Sojabohne (Lindermayr et al., 2002) über differenzierte Expressionsprofile und können in einigen Fällen mit der Bildung bestimmter Phenylpropanoid-Endprodukte assoziiert werden. Deutliche Substratpräferenzen konnten bei der Charakterisierung aller bislang bekannten 4CL-Isoformen beobachtet werden. Die 4CL spielt eine Schlüsselrolle zwischen den verschiedenen Zweigen des Phenylpropanoid-Metabolismus (Ehlting et al., 1999). Ob die einzelnen Isoformen durch ihre Fähigkeiten bevorzugt gewisse CoA-Ester

zu bilden, tatsächlich zur Synthese spezieller Klassen phenolischer Komponenten beitragen, wurde und wird zwar ausgiebig erforscht, konnte bis heute jedoch nicht eindeutig beantwortet werden (Ehlting et al., 1999; Lindermayr et al., 2002; Kumar und Ellis, 2003 und weitere).

Eine Arbeitsgruppe um Schneider (2003) postuliert die Existenz eines Motivs aus 12 Aminosäuren, die an der Bildung der Substrat-Bindetasche beteiligt sind und die Substratspezifität der 4CL bedingen. Diese Aminosäuren sind in den 4CL-Sequenzen der Abbildung 143 (Kap. 4.3.1) violett hervorgehoben. Das Homologie-Modell als Basis dieser Mutationsversuche war auch in diesem Fall die Kristallstruktur der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit (PheA) der Gramicidin-Synthetase I (Conti et al., 1997). Nach diesem Modell besteht die Substrat-Bindetasche (SBP) der 4CL aus zwei Domänen: Einer großen N-terminalen Domäne, zu der 11 der markierten 12 Aminosäuren zählen, und einer kleinen C-terminalen Domäne mit Lysin⁵²⁶.

Die Umsetzung von Ferulasäure und anderen substituierten Zimtsäure-Derivaten wird durch einen Größenausschlussmechanismus in der SBP kontrolliert. Ob *t*-Zimtsäure umgesetzt wird, hängt hingegen vorrangig von der Hydrophobizität der SBP ab. Sinapinsäure wird nur von solchen 4CL aktiviert, in denen eine der beiden konservierten benachbarten Aminosäuren Valin oder Leucin verloren gegangen ist. Dies ist beispielsweise in der Aminosäuresequenz der 4CL4 aus *Arabidopsis thaliana* (Abb. 143) oder der 4CL1 aus *Glycine max* der Fall. Letztere war eine der ersten 4CL-Isoformen, an der die Umsetzung der Sinapinsäure beobachtet werden konnte (Lindermayr et al., 2002).

Durch Übertragung dieser Aussagen auf die Proteinsequenz der Melisse ist folgende Vorhersage möglich: Eine Umsetzung von Ferulasäure sollte nicht stattfinden, da an den entscheidenden Positionen der Proteinsequenz die Aminosäuren Prolin²⁷⁹ und Methionin³⁰⁶ zu finden sind, welche die Aktivierung sterisch verhindern. Sinapinsäure kann nicht umgesetzt werden, da sowohl Valin³²¹ als auch Leucin³²² in der Proteinsequenz des Enzyms auftreten. Tatsächlich werden nur 4-Cumarsäure, Kaffeesäure und in geringem Umfang auch *t*-Zimtsäure von der klonierten 4CL-Isoform der Melisse zum entsprechenden CoA-Ester aktiviert.

Die ermittelten apparenten K_m -Werte lassen keine Präferenzen der 4CL-Isoform gegenüber 4-Cumarsäure (8 $\mu\text{mol/l}$) oder Kaffeesäure (7 $\mu\text{mol/l}$) erkennen. Beide werden mit sehr guten Reaktionsausbeuten umgesetzt. Mindestens ebenso gut werden 4-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA von der Rosmarinsäure Synthase als Substrate akzeptiert. Die apparenten K_m -Werte liegen im Bereich von 2 bis 7 $\mu\text{mol/l}$. Neben den zuvor diskutierten korrelierenden mRNA-Expressionsleveln spricht auch diese übereinstimmende Substrat-Produkt-Präferenz für eine Beteiligung der klonierten 4CL an der Rosmarinsäure-Biosynthese. Ob jedoch tatsächlich eine Assoziation zwischen dieser 4CL-Isoform und der Rosmarinsäure-Synthese besteht, kann erst nach vollständiger Charakterisierung aller 4CL-Isoformen der Melisse endgültig beurteilt werden. Schließlich wäre es auch denkbar, dass mehrere Isoformen gleichermaßen spezifisch oder unspezifisch an der Rosmarinsäure-Biosynthese beteiligt sind. Die Akkumulation des Sekundärmetaboliten nach Elicitierung ist nicht nur durch vermehrte Transkription einer Genkopie möglich sondern auch durch die Expression weiterer 4CL-Isoformen, die Substrate für die RAS zur Verfügung stellen.

Die zentrale Position der 4CL im Phenylpropanstoffwechsel und die Möglichkeit durch Mutation ein Enzym mit bestimmten Substratpräferenzen zu synthetisieren, machen dieses Enzym zu einem möglichen Regulatorprotein für gezielte Sekundärstoff-Biosynthese in höheren Pflanzen (Lindermayr et al., 2002). Gleichzeitig verdeutlichen sie seine Rolle als Schlüsselenzym und eventuell auch begrenzenden Faktor der Sekundärstoff-Biosynthese.

4.3.5 Evolution der Hydroxyzimtsäure:Coenzym A-Ligase

Die bislang bekannten 4CL-Gene können zwei phylogenetischen Klassen zugeordnet werden (Ehlting et al., 1999) (Abb. 144). Auch wenn eine strikte Funktionstrennung nicht möglich ist, werden 4CL-Proteine der Klasse II gewöhnlich mit der Flavonoidbiosynthese assoziiert, Klasse I-Proteine sollen hingegen vorrangig an der Biosynthese von Lignin und strukturell verwandten löslichen oder Zellwand-gebundenen Phenylpropanoidderivaten beteiligt sein (Ehlting et al., 1999; Cukovic et al., 2001; Hamberger und Hahlbrock, 2004). Beide Klassen haben sich bereits vor der Differenzierung der Angiospermen entwickelt. Diese frühe Entwicklung zeigt sich darin, dass Mitglieder einer Klasse, auch wenn sie aus unterschiedlichen Taxa stammen, untereinander enger verwandt sind als mit Mitgliedern der zweiten Klasse (Cukovic et al., 2001). Strukturelle und funktionelle Unterschiede spiegeln dies wider (Kumar und Ellis, 2003).

Die beiden 4CL-Gene der Petersilie (*Petroselinum crispum*) verfügen über 4 Introns, die nicht nur in ihrer Position, sondern auch in ihrer Sequenz hoch konserviert sind. Aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit - die Proteinsequenzen der Isoformen unterschieden sich in lediglich 3 Aminosäuren - sind sie ein Beispiel für eine Genduplikation in jüngster Vergangenheit (Lozoya et al., 1988).

In vielen der bislang untersuchten Dikotyledonen treten mehrere 4CL-Proteinsequenzen auf, die der Klasse I zugeordnet werden können, aber lediglich eine 4CL-Sequenz, die zur Klasse II zählt (Kumar und Ellis, 2003). In einigen Pflanzen, beispielsweise *Petroselinum crispum* (Lozoya et al., 1988) und *Salvia miltiorrhiza* (Zhao et al., 2006), konnten bislang nur 4CL-Gene der Klasse I identifiziert werden. Es ist denkbar, dass die 4CL-Isoform der Klasse II in diesen Pflanzen im Laufe der Evolution verloren gegangen und funktionell durch Klasse I-Isoformen ersetzt wurde (Ehlting et al., 1999). Aus diesem Grund ist es nicht möglich, aus dem Entwicklungszeitpunkt einer an der Biosynthese der Rosmarinsäure beteiligten 4CL auf den evolutionären Ursprung der Rosmarinsäure-Biosynthese zu schließen.

4CL-Proteinsequenzen der Monokotyledonen bildeten in einem von Kumar und Ellis (2003) erstellten phylogenetischen Stammbaum eine eigene Gruppe. Ob es sich in diesem Fall tatsächlich um die postulierte Klasse III oder lediglich eine Untergruppe der Klasse I oder II handelt, wird sich erst zukünftig zeigen.

Die aus *Melissa officinalis*-Suspensionskulturzellen klonierte 4CL kann sowohl aufgrund ihrer Position im Kladogramm (Abb. 144) als auch aufgrund der bestehenden hohen Sequenzähnlichkeit mit den 4CL-Proteinsequenzen aus *Salvia miltiorrhiza* (92 %) der Klasse I zugeordnet werden.

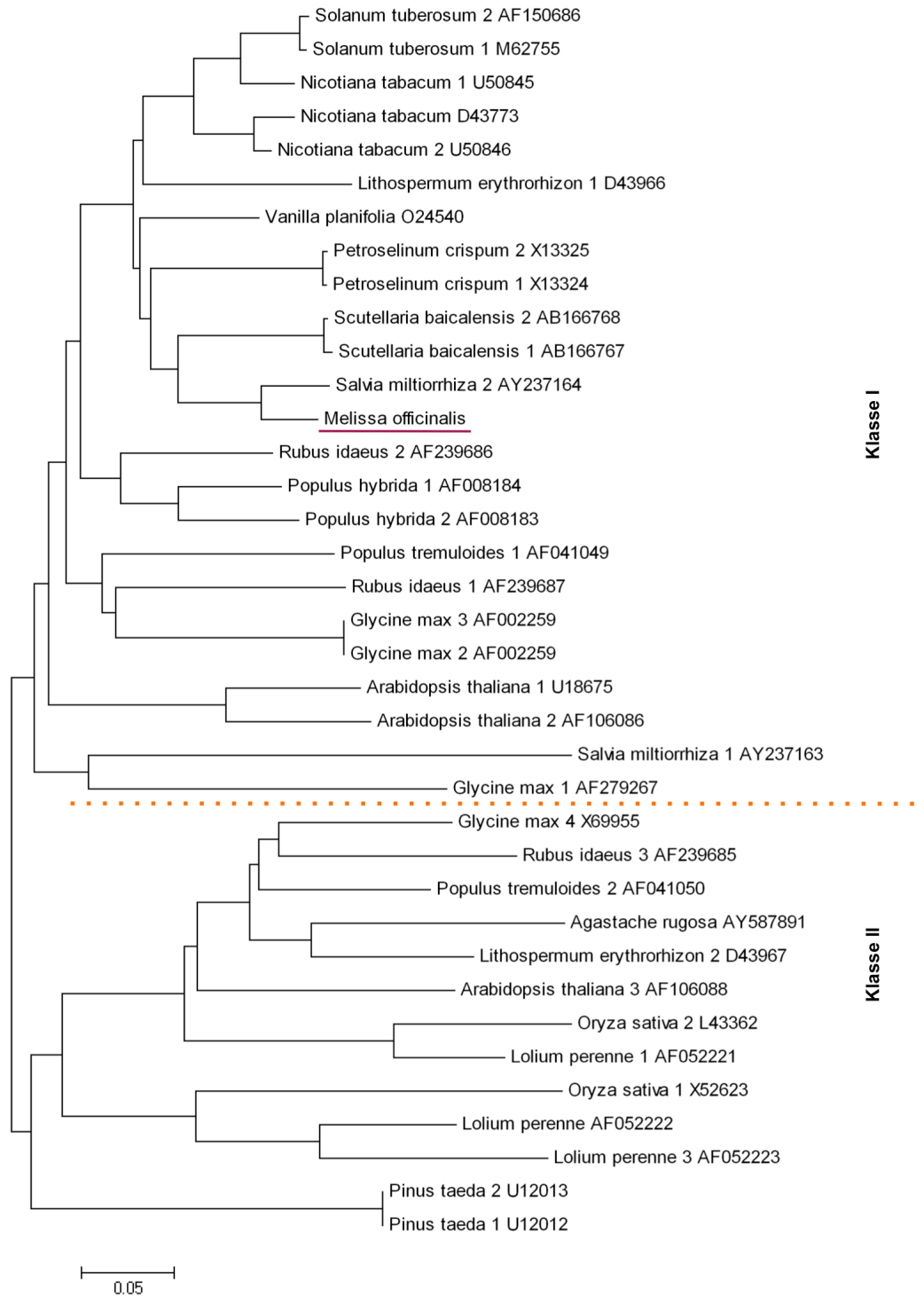


Abb. 144: Phylogenetischer Stammbaum der 4CL (modifiziert nach Lindermayr et al., 2002).

Zur Erstellung des Kladogramms wurden 37 4CL-Proteinsequenzen (Bezeichnung mit EMBL-Eintrag). Das klonierte Enzym aus Melisse kann aufgrund seiner Proteinsequenz den 4CL der Klasse I zugeordnet werden.

4.4 Tyrosin Aminotransferase

Weniger gut untersucht als die Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels sind Tyrosin Aminotransferase (TAT) und Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR), die die Umwandlung des L-Tyrosins zum 4-Hydroxyphenyllactat katalysieren.

Nachdem De-Eknamkul und Ellis (1987a) die Beteiligung der Tyrosin Aminotransferase an der Rosmarinsäure-Biosynthese nachgewiesen hatten, führten sie eine genaue Untersuchung dieses Enzyms in Rosmarinsäure-produzierenden Suspensionskulturen von *Anchusa officinalis* durch. Obwohl die TAT sowohl aus *Coleus blumei* (= *Solenostemon scutellarioides*) (EMBL-Eintrag: AJ458993) (Lahrmann et al., unveröffentlicht) als auch aus *Salvia miltorrhiza* (EMBL-Eintrag: DQ334606) (Huang et al., 2008) kloniert werden konnte, ist dies die einzige veröffentlichte detaillierte Untersuchung dieses Enzyms in Rosmarinsäure-produzierenden Pflanzen und eine der wenigen Untersuchungen dieses Enzyms in Pflanzen überhaupt. 1994 fand in Zusammenhang mit Untersuchungen zur Rosmarinsäure-Biosynthese in *Coleus blumei* auch eine Charakterisierung der nativen TAT statt. Die Ergebnisse dieser Arbeit liegen, zusammengefasst in einer Diplomarbeit, vor (Kempin, 1994).

Untersuchungen der TAT aus *Arabidopsis thaliana*, die von Holländer-Czytko und ihren Mitarbeitern durchgeführt wurden, sollten Licht auf die Rolle des Enzyms im Primärstoffwechsel der Pflanze, genauer in der Tocopherol-Biosynthese, werfen (Lopukhina et al., 2001; Sandorf und Holländer-Czytko, 2002). Der Großteil aller Publikationen zur TAT thematisiert jedoch die Beteiligung des Enzyms im Metabolismus der Leber von Säugetieren oder im Stoffwechsel von Parasiten.

4.4.1 Kinetische Parameter der TAT im Proteinrohextrakt aus Melissen-Suspensionszellen

Die im Proteinrohextrakt aus Melissen-Suspensionszellen ermittelten kinetischen Parameter der TAT sind nur als angenäherte Werte zu verstehen, da eine ausreichende L-Tyrosin-Konzentration im Reaktionsansatz nicht löslich war (Kap. 2.3.4.4).

Der apparente K_m -Wert für L-Tyrosin konnte nach Linearisierung der Daten nach der Methode von Lineweaver-Burk mit 7,2 mmol/l abgeschätzt werden und erscheint, verglichen mit den übrigen in dieser Arbeit ermittelten apparenten K_m -Werten, ungewöhnlich hoch. Dennoch liegt er im Bereich der Werte, die zuvor für die TAT aus *Anchusa officinalis* (20 mmol/l) (De-Eknamkul und Ellis, 1987b) und für die fünf Isoformen der TAT aus Rattenleber (0,7-6,0 mmol/l) (Iwasaki et al., 1973; Hayachi et al., 1967) bestimmt wurden. Obwohl Kempin (1994) in ihrer Diplomarbeit keinen apparenten K_m -Wert für L-Tyrosin angibt, kann dieser anhand der Substratsättigungskurve abgeschätzt werden. Er liegt ebenfalls oberhalb von 6 mmol/l. Ob die für die TAT aus *Anchusa officinalis* (De-Eknamkul und Ellis, 1987b) und *Trypanosoma cruzi* (Tab. 7) (Montemartini et al., 1993) angegebenen Werte tatsächlich experimentell ermittelt oder ebenfalls abgeschätzt wurde, geht aus den entsprechenden Arbeiten nicht hervor. Die hohen apparenten K_m -Werte untermauern die Beobachtung, dass aromatische Aminotransferasen in Tieren, Mikro-

organismen und Pflanzen keine ausgeprägte Substratspezifität aufweisen (De-Eknamkul und Ellis, 1987b). Dies ist insofern sinnvoll, als anderenfalls die aromatischen Aminosäuren in den Zellen zum größten Teil durch die Aminotransferasen abgebaut würden und dementsprechend für andere Reaktionen nicht zur Verfügung stehen könnten.

In Tabelle 7 sind die Charakteristika der zuvor diskutierten TAT noch einmal zusammengefasst. Die pH-Optima der drei Pflanzen-TAT korrelieren gut miteinander. Aus dem ungewöhnlich hohen pH-Optimum der TAT in *Anchusa officinalis* und der auffälligen Ähnlichkeit zum pH-Optimum der PAL leiteten De-Eknamkul und Ellis (1987b) eine Spezifität des Enzyms für die Rosmarinsäure-Biosynthese ab. Das pH-Optimum der Melissen-PAL wurde im Proteinrohextrakt aus Suspensionskulturzellen im Bereich von pH 7,85 bis 8,50 ermittelt und entspricht demzufolge ebenfalls ungefähr dem pH-Optimum der TAT. Fraglich ist jedoch, ob die Übereinstimmung der pH-Optima zweier Enzyme ausreicht, diese mit einem bestimmten Sekundärstoff-Metabolismus zu assoziieren. Derzeit gilt die RAS als eines der möglicherweise spezifische Enzyme der Rosmarinsäure-Biosynthese. Ihr pH-Optimum liegt bei pH 7,0 und demnach deutlich tiefer.

TAT aus (EMBL-Eintrag)	Temperatur- optimum	pH- Optimum	K _m für L-Tyrosin	K _m für 2- Oxoglutarat	Quelle
<i>Melissa officinalis</i> RE aus Suspensionskul- turzellen	60 °C	8,5 in Tris/HCl	7,2 mmol/l	28 µmol/l (LB) 40 µmol/l (HW)	Kap. 2.3.4
<i>Coleus blumei</i> RE aus Suspensionskul- turzellen	45–50 °C	9,0 in Tris/HCl	> 6 mmol/l	41 µmol/l (LB) 72 µmol/l (HW)	Kempin, 1994
<i>Anchusa officinalis</i> RE aus Suspensionskul- turzellen	60 °C	8,8-9,6 in Tris/HCl	20 mmol/l	n.a.	De-Eknamkul und Ellis, 1987b
<i>Rattenleber</i> eine TAT-Isoform	n.a.	7,5 in diversen Puffersystemen	1,7 mmol/l	0,7 mmol/l	Hayashi et al., 1967
<i>Trypanosoma cruzi</i> (AAA02975)	n.a.	7,0 in HEPES- Puffer	6,8 mmol/l	38 mmol/l	Montemartini et al., 1993

Tab. 7: Kinetische Parameter diverser TAT.

Um die Übersichtlichkeit der Tabelle zu gewährleisten wurden folgende Abkürzungen verwendet: LB: Linearisierung nach der Methode von Lineweaver-Burk; HW: Linearisierung nach der Methode von Hanes-Woolf; n.a. : nicht angegeben

4.4.2 Expression der TAT und Beteiligung des Enzyms an der Rosmarinsäure-Biosynthese

Die höchste TAT-Aktivität wurde während der Charakterisierung der *Melissa officinalis*-Suspensionskultur in CB2-Medium am 3. Tag gemessen. Anschließend fiel die Aktivität des Enzyms bis zum 7. Tag kontinuierlich ab ohne zum Ende der Charakterisierung erneut anzusteigen. Eine geringe TAT-Aktivität war jedoch auch in den letzten Tagen der Charakterisierung messbar. Insofern korreliert die TAT-Aktivität sowohl mit den Aktivi-

täten der übrigen Enzyme der Rosmarinsäure-Biosynthese als auch mit der Rosmarinsäure-Akkumulation im Kulturverlauf. Anhand dieses übereinstimmenden Verlaufs konnten De-Eknamkul und Ellis (1987a) die Beteiligung des Enzyms am Biosyntheseweg belegen.

4-Hydroxyphenylpyruvat, das Produkt der TAT, ist nicht nur ein Zwischenprodukt der Rosmarinsäure-Biosynthese, es wird über Homogentisinsäure auch in Tocopherole und Plastochinone umgewandelt (Sandorf und Holländer-Czytko, 2002). Diese drei Produkte dienen den Pflanzen aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften als Radikalfänger und schützen sie in Stress-Situationen. Obwohl die Tocopherole und Plastochinone in den Chloroplasten zu finden sind, weist derzeit alles darauf hin, dass die TAT im Cytosol lokalisiert ist, ein Teil der Tocopherol- und Plastochinon-Biosynthese also außerhalb der Chloroplasten stattfindet.

Erste Untersuchungen der TAT-Enzymaktivität in *Anchusa officinalis*-Zellkulturen offenbarten die Anwesenheit dreier Isoformen (De-Eknamkul und Ellis, 1987b). Mizukami und Ellis (1991) konnten später zeigen, dass die Aktivität einer Isoform in direktem Zusammenhang mit der Rosmarinsäure-Biosynthese steht. Eine zweite Isoform ist verantwortlich für den kurzfristigen Anstieg der TAT-Aktivität, der nach dem Überimpfen der Zellkultur in frisches Medium beobachtet werden konnte. Diese als „Transfer“- oder „Verdünnungseffekt“ bezeichnete rasche Aktivierung von Enzymen des Sekundärmetabolismus trat bei Melissenkulturen nicht auf. Die dritte TAT-Isoform wurde unabhängig vom Wachstumszustand der Zellen exprimiert und soll als Aspartat Aminotransferase am Primärstoffwechsel beteiligt sein. Auch in *Coleus blumei*-Zellkulturen konnten zwei Isoformen der TAT identifiziert werden (Kempin, 1994). Ihre Expressionsprofile wurden bislang nicht näher untersucht.

Eine verstärkte Expression der TAT nach Elicitierung wurde in *Arabidopsis* und *Salvia miltiorrhiza* nachgewiesen (Lopukhina et al., 2001; Huang et al., 2008). Ebenso wie die 4CL könnte auch die TAT ein Schlüsselenzym sein, dessen Isoformen gezielt Einfluss auf die Produktion des einen oder anderen Metaboliten ausüben. Die von Ellis und seinen Mitarbeitern erzielten Ergebnisse weisen bereits auf eine solche Möglichkeit hin. Nach Klonierung der TAT aus *Melissa officinalis*-Suspensionskulturzellen ist es sinnvoll, auch für dieses Enzym mit Hilfe des Southern Blotting die Zahl der Genkopien zu bestimmen und gegebenenfalls die Expressionsprofile der einzelnen Isoformen näher zu untersuchen, um mehr über die Rolle der TAT in der Rosmarinsäure-Biosynthese zu erfahren.

4.4.3 Klonierung einer putativen TAT aus *Melissa officinalis*

Aus dem phylogenetischen Stammbaum in Abbildung 13 (Kap. 1.2.7) geht hervor, dass die TAT aller Organismen im Laufe der Evolution konserviert blieb und enge spezies-spezifische Verwandtschaftsverhältnisse bestehen (Huang et al., 2008). Auf Basis der bekannten TAT-Sequenzen aus Pflanzen wurden Primer für konservierte Regionen gestaltet, die ein Stück von etwa 1015 Basenpaaren flankieren. Ein Stück von 950 bp konnte bereits erfolgreich amplifiziert und nach Ligation in pGEM-T® sequenziert werden. Dieses Amplifikat weist auf Nukleotidebene eine hohe Übereinstimmung mit den bereits

bekannten TAT-Sequenzen aus *Salvia miltiorrhiza* (EMBL-Eintrag: DQ334606) (94 %) (Huang et al., 2008) und *Coleus blumei* (EMBL-Eintrag: AJ458993) (86 %) (Lahrman et al., unveröffentlicht) auf. Durch RACE-PCR war es möglich, auch den N-Terminus aufzuklären. Abbildung 145 zeigt ein Alignment der „TAT“-cDNA aus Melisse (*Melissa*) und den TAT-cDNA-Vollängen aus Chinesischem Salbei (*Salvia miltiorrhiza*) und Buntnessel (*Coleus blumei*). Die Abbildung verdeutlicht einerseits die hohe Sequenzidentität auf Nukleotidebene, andererseits weist sie darauf hin, dass die Melissen-„TAT“ am C-Terminus noch unvollständig ist. Sobald die vollständige cDNA der Melissen-„TAT“ bekannt ist, soll das Protein heterolog in *E. coli* exprimiert und charakterisiert werden.

Melissa	ATGGAGTTGCAGAATTCAGCGCAGGAGATGGACGCGCCGAAGACCATCACGATTAAGGGG	60
Salvia	ATGGAGTTGCAGAATCCAGCGCAGGAGATCGACGCGCCGACTACCATCACCATTAAGGGG	60
Coleus	ATGGAGTTGCAGAATTCAGCGCAGGAAATGGAAGCGCCGACCACCATACGATTAAGGGG	60

Melissa	ATTTTAGGGTTGTTGATGTGCAACACGGATCCCAAGGAGAACGGGAAAAGAGTGATTCT	120
Salvia	ATTTTGGGGTTGTTGATGTGCAAGTACGGATCCGAAGGAGAGCGGGAAGAGAGTAATTCG	120
Coleus	ATTTTGGGGCTGTTGATGGCAACACCGATGCCAAGGAGAACGGGAAAAGAGTGATTCT	120

Melissa	CTCGGAATTGGGGATCCGACTGCGTATTCGTGCTTCCACGCTAGTAATGCTGCTCAGGAA	180
Salvia	CTGGGGATTGGGGATCCGACTGCGTATTCGTGCTTCCACGCTAGTAATGCGGCTCAGGAA	180
Coleus	CTTGGAATCGGAGATCCGACTGCTATTCGTGCTTCCACGCTAGTAATGCCGCTCAGGAA	180
	**	
Melissa	GGTGTGTGGAGGCTCTGCGCTCCGCAAAATTCAACGGCTACGCTCCCACTGCTGGTCTT	240
Salvia	GGTGTGTGGAGGCTCTGCGCTCCACCAAAATTCAACGGCTACGCTCCCACTGCTGGTCTT	240
Coleus	GGTGTGTGCGAGTGCCCTTCGCTCCGCCAAATTCAACGGCTACGCTCCCACTGCTGGTCTT	240

Melissa	CCGCAAAACCAGAGAGGCTATCGCGGAGTATTTGTCCCGGATCTCCCTACAAGCTACCA	300
Salvia	CCACAAACCAGAGAGGCAATCGCCGAGTATTTGTACGAGATCTCCCTACAAGCTACCG	300
Coleus	CCTCAAACAAGACAGGCAATTGCGAGACTTATCTCGCGATCTCCCTACAAGTACCA	300
	**	
Melissa	GCCGACTCTGTCTATGTACAGCGCGGTTGCACACAAGCCATTGAAATCGCATTGTCCGTT	360
Salvia	GCCGACTCTGTGTATGTACAGCGCGGCTGCACACAAGCCATTGAGATAGCATTGTCCGTT	360
Coleus	GCGGAAAGCGTCTACGTACAGCGCGGCTGCACGAAGCTATCGAGATAGCATTATCAGTT	360
	**	
Melissa	TTGGCTCGCCCCGGTGCTAATATCTTGCTGCCAAGACCGTGTTTCCCAATCTACGGGCTT	420
Salvia	TTGGCTCGCCCCGGTGCTAATATCTTGCTGCCGAGACCGTGTTTCCCGATATACGGGCTT	420
Coleus	TTGGCCCGACCGGTGCTAACAATCTTGCTTCCGAGACCATGTTTCCCAATCTACGGACTC	420

Melissa	TGTGCCTCATTTAGAAATATCGAAGTCCGCTACTTCGATCTTCATCCCGAGAAGGGATGG	480
Salvia	TGCGCCTCGTTTAGAAATATCGAAGTCCGCTACTTCGATCTTCACCCGAGCAGGGATGG	480
Coleus	TGCGCCTCATTCAGAAACATCGAAGTTCGCTACTTCGATCTTCATCCCGAGAAGGGATGG	480
	**	
Melissa	GAAGTTGATCTCGATGCAGTAGTAGATTTGGCTGACCACAATACAGTTGCAATGGTGATC	540
Salvia	GAGGTTGATCTCGATGCAGTAGCAGATTTGGCAGACCACAATACAGTTGGCAATGGTGATC	540
Coleus	GAGGTCGATCTCCAAGCAGTCGAAGATTTGGCAGATCACAACACAGTTGCTATGGTGATC	540
	**	
Melissa	ATCAATCCTGGGAATCCATGTGGAACGTCTACTCACATCAGCACCTTAAGAAGGTTGCA	600
Salvia	ATCAATCCTGGGAATCCATGTGGAACGTCTACTCATATCAGCACCTAAAGAAGATTGCT	600
Coleus	ATAAACCTGGGAACCCATGTGGAACGTGTATTCATATCAGCACCTAAAGAAGGTTGCT	600
	**	
Melissa	GAGACGACGAAGAGGCTTGGTATAGTGGTGATTGCTGATGAAGTCTACGGACATCTGGCT	660
Salvia	GAGACAGCCAAGAGGCTTGGTATAGTGGTGATAGCCGATGAGGTCTACGGCCATCTGGCT	660
Coleus	GAGACAGCTAAGAGGCTGGGGATAGTTGTGATTGCCGACGAGGTTTACGGCCACCTGGCA	660

Diskussion

Melissa	TTCGGGGCGAACCCCTTTTGTTCGAATGGGAATATTCGGGTCAATAGCGCCAGTGGTGACG	720
Salvia	TTCGGGGCGAACCCCTTTTGTTCGATGGGAATATTCGGGTCAATTGCCCCGGTGGTGACG	720
Coleus	TTCGGAGCGAACCCCTTCGTGCCGATGGGGAATTCGGATCGATAGCTCCGGTGGTGACG *****	720
Melissa	CTTGATCTTTATCCAAGAGATGGTTGGTTCCTGGTTGGCGCCTTGGTTGGTTGGTCATC	780
Salvia	CTTGATCTTTGTCTAAGAGATGGTTGGTTCCTGGCTGGCGCCTTGGTTGGTTGGTCATC	780
Coleus	CTGGATCTTTGTCTAAGAGATGGTTGGTCCCTGGTTGGCGACTTGGTTGGTTGGTGATT **	780
Melissa	AATGACCCTGATGGTAGTTTGATGAGCCCTAAGTTTGTGAACGCATTAAGAAATACTGT	840
Salvia	AATGACCCTGATGGCAGTTTGATGAGCCCAAAGTTTGTGGAACGCATCAAGAAATACTGT	840
Coleus	AATGATCCTGACGGCACTTTGATGAGCCCAAAGTTTGTGGAGCGCATAAAGAAATACTGC *****	840
Melissa	GACATTTGCGGAGGTCTGCTACATTCATACAGACTGCAGTTCCCGAAATTGTTGAGCAA	900
Salvia	GACATCTGCGGAGGTCTGCTACATTCATACAGGCTGCAGTTCCCGAAATTGTTGAGCAA	900
Coleus	GACATTTGCGGAGGGCCTGCTACATTCATACAGGCGCAGTTCCAGAAATTGTTGAGCAA *****	900
Melissa	ACACAAG AAG TTTCTTCAGGAAAACAATCAACATACTGAAGCAAACCTCTGATATCTGT	960
Salvia	ACACAAG AAG TTTCTTCAGGAAAACAATTAACATACTGAAGCAAACCTCTGATATCTGT	960
Coleus	ACACAGG AAG TTTCTTCAGGAAAACAATTAATATTCTGAGGCAGACTTCTGATATCTGT *****	960
konserviertes Lysin		
Melissa	TACCAAAAGATTGAAGACATCAATGGCATTACTTGTCCAACAAAACCAAAGGAGCAATG	1020
Salvia	TACCAAAAGATTGAAGACATCAATGGCATCACTTGTCCAACAAAACCTAAGGGAGCAATG	1020
Coleus	TGCCAAAAGATAGAAGAAATTGATGGCATAACTTGTCCAACGAAGCCAAAAGGAGCAATG * *****	1020
Melissa	GCTTTGATCCTGAAGCTGAATATTTCCAGGATGAAAGAT-----	1059
Salvia	GCTTTCATGGTGAAGCTGAATCTTTCCAGGATGAAAGATATTAGTGATGATATTGACTTC	1080
Coleus	GCTTTCATGGTGAAGCTGAATATTTCCCGATGAAAGACATTAGTGATGATATTGACTTC *****	1080
Melissa	-----	
Salvia	TGTTTCAAGCTGGCCAAAGAGGAATCTGTTATCATTTCTCCAGGGCTCGCTGTGGGTCTG	1140
Coleus	TGTTTCAAGCTGGCCAAAGAGGAATCTGTTATAATTCTTCCTGGAATTGCTGTGGGCCTA	1140
Melissa	-----	
Salvia	AAGAACTGGATCCGGATCACATTTGCAGTAGACGTGCCTGCTCTGAAGAAGCCATGGAG	1200
Coleus	AACAACCTGGCTCCGAATCACATTTGCAGTTGAGCCATCTGCTCTGAAGAGGCCATGGAG	1200
Melissa	-----	
Salvia	AGGCTCAAGTCTTTCTGTGAACGGCACTCCTACTAA	1236
Coleus	AGGCTCAAGTCTTTCTGCATACGGCACTCCTACTAA	1236

Abb. 145: Sequenzvergleich einer cDNA-Sequenz für eine mögliche TAT aus Melisse mit den TAT-cDNA-Vollängen aus Buntnessel und *Salvia miltiorrhiza*

Wie Holländer-Czytko mündlich mitteilte, handelt es sich bei der von ihr und ihren Mitarbeitern klonierten Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (EMBL-Eintrag: AF268090) (Lopukhina et al., 2001) vermutlich doch nicht, wie zunächst angenommen, um eine Coronatin-regulierte TAT, sondern sehr wahrscheinlich um eine Cystein-Aminotransferase. Ob es sich bei dem aus *Coleus blumei* klonierten Enzym, welches in den Datenbanken als TAT bezeichnet ist, tatsächlich um eine Tyrosin Aminotransferase handelt, steht laut Petersen trotz sorgfältiger Charakterisierung der Enzymaktivität nach wie vor nicht eindeutig fest. Huang et al. (2008) weisen in ihrer Veröffentlichung darauf hin, dass die

Benennung des aus *Salvia miltiorrhiza* klonierten Enzyms nicht aufgrund funktioneller Charakterisierung erfolgte, sondern auf Sequenzähnlichkeiten zu anderen Enzymen der Datenbank basiert.

Ungeachtet der hohen Sequenzidentität zwischen der Melissen-„TAT“ und anderen TAT-Sequenzen soll die Rolle dieses Enzyms in der Rosmarinsäure-Biosynthese erst nach sorgfältiger und kritischer Charakterisierung der Enzymaktivität ausführlicher diskutiert werden kann.

4.5 Hydroxyphenylpyruvat Reduktase

4.5.1 Expression der HPPR

Während der Charakterisierung einer *Melissa officinalis*-Suspensionskultur in CB2-Medium wurde die höchste HPPR-Aktivität am 3. Kulturtag gemessen. Von Beginn der Charakterisierung bis zu diesem Maximum wurde eine kontinuierliche Zunahme der Enzymaktivität beobachtet, nach dem 3. Kulturtag nahm die Aktivität wieder beständig ab. Soweit korreliert das Expressionsprofil der HPPR den Ergebnissen, die im Verlauf der Charakterisierung für die übrigen Enzyme der Rosmarinsäure-Biosynthese ermittelt wurden und stimmt gut mit der Rosmarinsäure-Akkumulation überein. Allerdings ist bereits nach dem 6. Kulturtag keine HPPR-Aktivität mehr detektierbar. Damit ist die HPPR das einzige Enzym, dessen Aktivität nicht über den gesamten Charakterisierungszeitraum nachweisbar ist. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Suspensionskulturen von *Coleus blumei* gemacht, wo die HPPR das erste Enzym war, das bei abnehmender Rosmarinsäure-Akkumulation im Laufe zunehmender Passagenzahl nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Petersen, mündliche Mitteilung).

4.5.2 Charakterisierung der HPPR

Die Charakterisierung der HPPR erfolgte wie die Charakterisierung der übrigen Enzyme durch Quantifizierung der entstandenen Reaktionsprodukte. Hierzu wurde die Methode der HPLC gewählt (Kap. 2.3.7). Eine zufriedenstellende Integration des entstandenen Produktes war insbesondere bei Testansätzen mit hohen pHPP-Konzentrationen und kurzen Inkubationszeiten kaum möglich, da die kleinen Produktpeaks teilweise von einem großen Peak überlagert wurden. Aufgrund dessen erwies sich insbesondere die Bestimmung des apparenten K_m -Wertes für NADPH als schwierig. Dasselbe Problem wurde bereits von Janiak (2007 und mündliche Mitteilung) beschrieben und kann von Hücherig (mündliche Mitteilung) bestätigt werden. Auch Wierckx und seine Mitarbeiter (2008) weisen auf eine entsprechende Problematik bei der HPLC hin. Der störende Peak konnte, wie Abbildung 78 verdeutlicht (Kap. 3.2.5), auf Abbauprodukte des instabilen pHPP zurückgeführt werden. Diese treten auf, wenn kommerziell erworbenes pHPP,

gelöst in wässrigen Lösungen, nach Ansäuern des Reaktionsansatzes mit Ethylacetat ausgeschüttelt wird. pHPP, welches katalysiert durch die TAT aus L-Tyrosin entstanden ist, erfährt hingegen durch Ansäuern des Testansatzes und Ausschütteln mit Ethylacetat keine Zersetzung. Die Anwesenheit von Abbauprodukten in kommerziell erworbenem pHPP konnte als Ursache der Störung insofern ausgeschlossen werden, als die HPLC-Chromatogramme des gelösten Substrates tadellos sind. Eine Erklärung für das beobachtete Phänomen steht aus.

Die für die HPPR im Proteinrohextrakt aus Melissen-Suspensionskulturzellen ermittelten kinetischen Parameter liegen in einer Größenordnung mit den Werten, die zuvor für die native HPPR aus *Coleus blumei* bestimmt wurden (Häusler et al., 1991; Meinhard et al., 1992), auch wenn die ermittelten apparenten K_m -Werte der native Melissen-HPPR insgesamt etwas niedriger sind. Bei Bestimmung des apparenten K_m -Wertes für pHPP wurde oberhalb einer Substratkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ eine leichte Substrathemmung beobachtet.

Besondere Aufmerksamkeit verdienen die Ergebnisse der Bestimmung des pH-Optimums. Kapitel 2.3.5.4 zeigt, dass ein pH-Optimum in diesem Sinne nicht ermittelt werden konnte. In 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer wurden in einem pH-Bereich von etwa pH 5,0 bis 9,0, gemessen im Reaktionsansatz, an jedem Testpunkt etwa gleiche spezifische Enzymaktivitäten bestimmt. Obwohl ein dermaßen breites pH-Optimum unwahrscheinlich erscheint, konnte das Ergebnis selbst bei Verkürzung der Inkubationszeiten mehrfach reproduziert werden. Auch Testansatz, die DHPP anstelle von pHPP als Substrat enthielten, ließen kein pH-Optimum erkennen. Deutlich niedrigere Enzymaktivitäten wurden lediglich bei pH 1,35 gemessen. Zudem trat weder in Borsäure-Borax-Puffer noch in Britton-Robinson-Puffer in einem ähnlichen pH-Bereich ein Optimum auf. Die gemessenen HPPR-Aktivitäten lagen allerdings deutlich unter den Werten, die in $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer erreicht wurden.

4.5.3 Bedeutung der HPPR im Stoffwechsel der Pflanze

1988 erstmals von Petersen und Alfermann beschrieben, galt die HPPR lange Zeit als eines von möglicherweise lediglich vier spezifischen Enzymen im Biosyntheseweg der Rosmarinsäure. Nach einer ersten Charakterisierung in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* (Meinhard et al., 1992) konnte die HPPR etwa zehn Jahre später aufgereinigt und anschließend von Kim und Janiak erfolgreich kloniert werden (EMBL-Eintrag: AJ507733) (Kim et al., 2004). Janiak war sogar in der Lage, das heterolog exprimierte Enzym zu kristallisieren und aus den Ergebnissen Aussagen über dessen Struktur und den Reaktionsmechanismus abzuleiten (Janiak, 2007; Janiak et al., zur Veröffentlichung eingereicht).

Wie Janiak (2007) zeigen konnte, korrelieren die kinetischen Parameter des rekombinanten Enzyms jedoch nicht mit den Ergebnissen der Charakterisierung der nativen HPPR. Zudem bestehen hohen Sequenzähnlichkeiten (87 % auf Aminosäure-Ebene) zwischen dem klonierten Enzym aus *Coleus blumei* und einer putativen D-Isomer spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana* (EMBL-Eintrag:

Q9CA90), einer Pflanze, in der keine Rosmarinsäure-Akkumulation nachgewiesen werden konnte. Eine Arbeitsgruppe um Timm et al. (2008) zeigte erst kürzlich, dass es sich bei diesem *Arabidopsis*-Enzym um eine cytosolische Hydroxypyruvat Reduktase (HPR2) handelt, die neben der bedeutenderen peroxisomalen HPR1 an der Photorespiration der Pflanze beteiligt ist. Der Ursprung des Enzyms ist demnach im Primärstoffwechsel zu finden.

Bislang kann nur darüber spekuliert werden, ob die von Meinhard durch Ammoniumsulfat-Fällung angereicherte HPPR aus *Coleus blumei* und die von Janiak klonierte H(P)PR tatsächlich identische Enzyme sind oder ob sie nur eng miteinander verwandt sind. Untersuchungen, die die Beteiligung beziehungsweise die Rolle der H(P)PR im Rosmarinsäure-Biosyntheseweg in *Coleus blumei* zum Thema haben, finden derzeit statt. In diesen Versuchen soll die H(P)PR *in vivo* durch RNAi ausgeschaltet werden. Erste Ergebnisse weisen daraufhin, dass die H(P)PR tatsächlich an der Rosmarinsäure-Biosynthese beteiligt ist, veranlassen andererseits jedoch die Annahme, dass im *Coleus blumei*-Genom mehrere Genkopien des Enzyms vorhanden sind (Hücherig, mündliche Mitteilung). Wie viele Isoformen des Enzyms tatsächlich exprimiert und durch die gewählte RNAi ausgeschaltet werden und wie hoch die Beteiligung der einzelnen Isoformen an der Biosynthese der Rosmarinsäure ist, ist nach wie vor nicht endgültig geklärt. Sollte es sich nur um ein Enzym handeln, so müsste es an zwei Stoffwechselwegen beteiligt sein, nämlich an der Photorespiration des Primärmetabolismus und der Rosmarinsäure-Biosynthese im Sekundärstoffwechsel (Petersen et al., 2009). Könnte tatsächlich eine spezifischere HPPR nachgewiesen werden, so kann davon ausgegangen werden, dass diese durch Genduplikation aus der cytosolischen HPR hervorgegangen ist.

4.6 Rosmarinsäure Synthese

4.6.1 cDNA-Volllängensequenz

Die RAS-Sequenzen aus Melisse und Buntnessel zeigen auf Nukleotidebene hohe Sequenzähnlichkeit (84 %). Aus diesem Grund war es möglich, das offene Leseraster der Melissen-RAS mithilfe der für *Coleus blumei* gestalteten Volllängenprimer zu klonieren. Das Enzym konnte nach Ligation der cDNA in den Vektor pET15b in *E. coli* des Stammes BL21(D3)pLysS überexprimiert und charakterisiert werden (Kap. 3.5).

2006 wurde nach Aufklärung der *Coleus*-RAS-Sequenz gezeigt, dass dieses Enzym zur Familie der BAHD-Acyltransferasen zählt (Berger et al., 2006), die Acylierung im pflanzlichen Primär- und Sekundärstoffwechsel katalysieren (D'Auria, 2006). Durch Kristallisation der Vinorin Synthase aus *Rauwolfia serpentina* konnten Ma et al. (2005) zeigen, dass in allen BAHD-Acyltransferasen zwei konservierte Sequenzmotive auftreten, deren Anwesenheit essentiell für die Enzymaktivität sind. Dies sind das HXXXD-Motiv in zentraler Position aller Acyltransferasen und das DFGWG-Motiv kurz vor dem C-Terminus. Letzteres ist, obwohl es sich auf der Außenseite der Vinorin Synthase befindet und somit

nicht an der Katalyse beteiligt sein kann, charakteristisch für alle BAHD-Acyltransferasen. Abbildung 146 zeigt einen Sequenzvergleich von vier BAHD-Acyltransferasen. Die beiden konservierten Motive sind hervorgehoben. Obwohl der evolutionäre Ursprung der BAHD-Acyltransferasen in den Chloramphenicol-Acyltransferasen (CAT) liegen soll (D'Auria, 2006), kann im Alignment keine Sequenzübereinstimmung erkannt werden.

Die Sequenzidentität zwischen der Melissen-RAS und den übrigen zum Sequenzvergleich ausgewählten BAHD-Acyltransferase beträgt auf Proteinebene 82 % zur RAS aus *Coleus blumei* (EMBL-Eintrag: A0PDV5) (Berger et al., 2006), 47 % zu einer Hydroxycinnamoyltransferase (HCT) aus *Nicotiana tabacum* (EMBL-Eintrag: CAE46932) (Hoffmann et al., 2003) und 23 % zur Vinorin Synthase aus *Rauwolfia serpentina* (EMBL-Eintrag: CAD89104) (Bayer et al., 2004).

Mo „RAS“	-----MRIDIKDSTMVKAETPG--GSVWLTNLLSPANYHTLSVHFYHHDGS--EN	50
Cb „RAS“	-----MKIEVKDSTMIKPSAETPG--GSLWLSNLDLSPANYHTLSVHFYSHDGS--DN	50
Nt „HCT“	MGSEKMMKINIKESTLVKPSKPTPT--KRLWSSNLDLIVGR-IHLLTVYFYKPNGS--SN	55
Rs „VS“	----MAPQMEKVSEELILPSSPTPQSLKCYKISHLDQLLLTCHIPFILFYPNPLDSNLDP	56
Si „CAT“	-----MTFNI IKLENWDRKEYFEHYFNQQTYSITK	31

. : . : . :

Mo „RAS“	FFDAAALKEALSRLVDFYPYAGRLKLKDN-RLEIDCNGEGVLLVEAESDGAL-AELGEF	108
Cb „RAS“	FFDAAGLKEALSRLVDFYPYAGRLKLNGN-RLEIDCNEGLLLVEAECGDAL-DELGDF	108
Nt „HCT“	FFDSKIMKEALS NVLVSFYPMAGRLARDEQGRIEINCNGEGVLFVEAESDAFV-DDFGDF	114
Rs „VS“	AQTSQHLKQSLSKVLTHFYPLAGRINVNSS----VDCNDSGVPFVEARVQAQLSQAIONV	112
Si „CAT“	EIDITLKFDMIKKKGYEIYP-----SLIYAI	57

*: : . : ** : .

konserviertes Glutamin (Beginn des „Q-Introns“)

Mo „RAS“	APRPDLN-LIPQVDYAKG---ISTYPLMLFQLTRFKCGGVGLGVANEHHLSDGVAALHFI	164
Cb „RAS“	APRPDLN-LIPKVDYSRG---ISTYPLMVFQLTRFKCGGVALGVANEHHLSDGVAALHFI	164
Nt „HCT“	TPSLELRKLIPTVDTSGD---ISTFPLIIFQVTRFKCGGVSLGGGVFHTLS DGLSSIHF	171
Rs „VS“	VELEKLDQYLPSSAAYPGGKIEVNEDVPLAVKISFFECGGTAIGVNLSHKIADVLSLATFL	172
Si „CAT“	MEVVNKNKVFRGTGENSEN-----KLGWYDK-----LNPLYTVFN-KQTEKFT	98

. : . : . : : : *

konservierte Proteinsequenz des aktiven Zentrums

Mo „RAS“	NTWAHLARGVPAPSPPPVFDRRSLSARNPPKPQFSHAQYQPPPTLPTPLDTAIAYSK--	222
Cb „RAS“	NTWAHLSRGAPAPTPLPHFDRSSLSARNPPQPQFSHAQYQPPPTLENPLPHTDIAHSR--	222
Nt „HCT“	NTWSDIARGLSVAIP-PFIDRTLLRARDPPTSSFEHVEYHPPPSLISSSKSLESTSPKPS	230
Rs „VS“	NAWTATCRG-ETEIVLPNFD---LAAR-----HFPPVDNTPSELPV---DENVMKR--	218
Si „CAT“	NIWTESDNN-----FTSFYNNYKNLDFEYKDKKEEMFPPK--	132

* *: . . * *

Mo „RAS“	----LKVTRDQLGALKAKCLAGDPG---KPRSTFEVLAGHIWRCVCAARGLPEDQETKL	275
Cb „RAS“	----FKLTRDQLNSLKSKFKTAPADGGAGKSYSTFEVLAGHIWRSVCIARGLPEGQETKL	278
Nt „HCT“	TTTMLKFSDDQLGLLKSXKH---DG-----STYEILAAHIWRCCKARALSDQLTKL	281
Rs „VS“	----FVFDKEKIGALRAQASSASEEK---NFSRVQLVVAYIWKHVIDVTRAKYGAKNKF	270
Si „CAT“	-----PIPENTIPISMIPWIDFSSFNLNIGNNSSF	162

. : . * . . :

Mo „RAS“	HIPFDGRAKLR--LPPGYFGNAIFFATPVATCGEIESNSLAHAVKRVGDAIARLDEDYLR	333
Cb „RAS“	HIPFDGRGRLQ--LPPGFFGNAIFFATPIATCGEIESNSLNAYARRVSDGVSRLDEDYLR	336
Nt „HCT“	HVATDGRSRLCPPLPGYLGNVVFTGTPMAKSELLQEPLTNSAKRIHSALS KMDDNYLR	341
Rs „VS“	VVVQAVNLRSRMNPPLPHYAMGNITALLFAAVDAEWDKDFPDIGPLRTSLEKTEDDHNH	330
Si „CAT“	LLPIITIGKFYS-----ENNKIYIPVALQLHHAUCDGYHASLFINEFQDI IKKVDWDI-	215

: : . . : : :

Mo „RAS“	SSIDFLELQEDISKLAQGAHSFRCPNLWVISWVRLPVYEPDFGWGKAVYMGPWAAPFEGK	393
Cb „RAS“	SSIDFLELQEDISKLAQGAHSFRCPNLWVISWVWLPIYEPDFGWGKAVYMGPWAAPFEGK	396
Nt „HCT“	SALDYLELLPDLSALIRGPTYFASPNLNINSWTRLFPVHSDFGWGRPIHMGPAICYEGT	401
Rs „VS“	ELLKGMTCLYELEPQE-----LLSFTSWCRLGFYDLDFGWGKPLSACTTTFPKRNA	381
Si „CAT“	-----	

charakteristische Sequenz der BAHD-Acyltransferase

Mo „RAS“	SYLLPNPD-NDGSLFVAITLHTQHMERFEKLFYEI-----	427
Cb „RAS“	SYLLPNPE-KDGSLEFVSITLHKQHMERFEKLFYEI-----	430
Nt „HCT“	VYILPSPNSKDRNLRLAVCLDADHMLPFEEKLYEF-----	436
Rs „VS“	ALLMDTRSGDGVAEAWLPMAEDEMAMLPVELLSLVDSDFSK	421
Si „CAT“	-----	

Abb. 146: Vergleich der Proteinsequenzen verschiedener BAHD-Acyltransferasen und einer CAT aus *Staphylococcus intermedius* (Schwarz et al., 1991). Bei den BAHD-Acyltransferasen handelt es sich um die RAS aus *Melissa officinalis*, eine RAS aus *Coleus blumei*, eine Hydroxycinnamoyltransferase (HCT) aus *Nicotiana tabacum* und die Vinorin Synthase (VS) aus *Rauwolfia serpentina*.

4.6.2 Charakterisierung der RAS

Tabelle 8 fasst die Ergebnisse der Charakterisierung der RAS sowohl im Proteinrohextrakt aus *Melissa officinalis*-Suspensionskulturen als auch als heterolog exprimiertes Enzym zusammen und erlaubt gleichzeitig den Vergleich mit Werten, die für die RAS aus *Coleus* ermittelt wurden.

Abgesehen von einer Ausnahme (K_m -Wert für pHPL mit Caffeoyl-CoA als Akzeptorsubstanz) korrelieren die Werte, die aus dem Proteinrohextrakt von Melissen-Suspensionskulturen ermittelt wurden, sehr gut mit den kinetischen Parametern des rekombinanten Proteins. Gute Übereinstimmung besteht auch zu den Werten, die von Sander für die heterolog exprimierte RAS aus *Coleus blumei* bestimmt wurden.

Die Frage nach dem „natürlichen“ Substrat der RAS kann anhand der Ergebnisse der Charakterisierung nicht eindeutig beantwortet werden, da alle ermittelten K_m -Werte für die CoA-Ester zwischen 2 und 7 $\mu\text{mol/l}$ liegen und damit nicht nur sehr klein sondern auch vergleichbar sind. Konkurrenzexperimente mit Reaktionsansätzen, die sowohl Caffeoyl-CoA als auch 4-Cumaroyl-CoA enthalten, fanden nicht statt. Auf Basis solcher Konkurrenzexperimente wurde 1991 von Petersen 4-Cumaroyl-CoA als bevorzugtes Substrat der RAS aus *Coleus blumei* postuliert.

Beachtenswert ist ferner die Beobachtung, dass die K_m -Werte der Melissen-RAS im Fall des pHPL vom Hydroxycinnamoyl-Donor abhängig sind. So beträgt der apparente K_m -Wert für pHPL mit 4-Cumaroyl-CoA für das heterolog exprimierte Enzym weniger als ein Zehntel des Wertes der mit Caffeoyl-CoA bestimmt wurde. Der apparente K_m -Wert für DHPL wurde in den Versuchen hingegen nicht vom eingesetzten CoA-Ester beeinflusst.

RAS aus (EMBL-Eintrag)	<i>Melissa officinalis</i> RE aus Suspensions- kulturzellen	<i>Melissa officinalis</i> rekombinantes Protein	<i>Coleus blumei</i> RE aus Suspensions- kulturzellen	<i>Coleus blumei</i> (AM283092)
Temperatur- optimum	45 °C	45 °C	30 °C (CaffCoA) 40 °C (4-CCoA)	40–45 °C
pH-Optimum	7,0 in KP	7,3 in KP	7,0-7,5 in KP	8,4 in KP
K_m für Caffeoyl-CoA	3 µM (pHPL) 6 µM (DHPL)	2 µM (pHPL) 3 µM (DHPL)	33 µM	2 µM (pHPL) 4 µM (DHPL)
K_m für 4-Cumaroyl-CoA	6 µM (pHPL) 2 µM (DHPL)	7 µM (pHPL) 3 µM (DHPL)	20 µM	9 µM (pHPL) 2 µM (DHPL)
K_m für pHPL	70 µM (CaffCoA) 14 µM (4-CCoA)	165 µM (CaffCoA) 12 µM (4-CCoA)	170 µM	163 µM (CaffCoA) 23 µM (4-CCoA)
K_m für DHPL	120 µM (CaffCoA) 120 µM (4-CCoA)	100 µM (CaffCoA) 70–100 µM (4-CCoA)	370 µM	193 µM (CaffCoA) 30 µM (4-CCoA)
Quelle	Kap. 2.3.6	Kap. 3.4.5	Petersen et al., 1994	Sander, unveröffentlicht

Tab. 8: Kinetische Parameter der RAS aus Melisse und Buntnessel.

Um die Übersichtlichkeit der Tabelle zu gewährleisten, wurden folgende Abkürzungen verwendet: KP: KH₂PO₄/K₂HPO₄-Puffer; pHPL: 4-Hydroxyphenyllactat; DHPL: 3,4-Dihydroxyphenyllactat; CaffCoA: Caffeoyl-CoA; 4-CCoA: 4-Cumaroyl-CoA

Ob das Substrat, welches *in vitro* am besten akzeptiert wurde, auch dem natürlichen Substrat des Enzyms entspricht, hängt selbstverständlich auch davon ab, welche Substrate *in vivo* tatsächlich für die RAS verfügbar sind. Dass die mit heterolog exprimierten Enzymen erzielten Ergebnisse nicht in allen Fällen auf die im Proteinrohextrakt aus der Pflanze oder gar in Pflanzenzellen vorherrschenden Bedingungen übertragen werden können, verdeutlicht folgende Beobachtung: Die klonierte 4CL-Isoform ist in der Lage, sowohl Kaffeesäure als auch 4-Cumarsäure mit guten Reaktionsausbeuten und ohne erkennbare Präferenz zu den entsprechenden CoA-Estern umzusetzen. Demnach sollten der RAS theoretisch sowohl 4-Cumaroyl-CoA als auch Caffeoyl-CoA als Substrate zur Verfügung stehen. Dies dürfte unabhängig vom Erntetag der Suspensionskultur der Fall sein, da die klonierte 4CL einer Expressionsstudie zufolge an alle Kulturtagen exprimiert wird. Die Ergebnisse der Charakterisierung der 4CL im Proteinrohextrakt aus Suspensionskulturzellen von *Melissa officinalis* vermittelten jedoch den Eindruck, es werde bevorzugt, wenn nicht ausschließlich, Kaffeesäure zum entsprechenden CoA-Ester umgesetzt. Ursache dieser Beobachtung könnte die Anwesenheit weiterer Enzyme im Proteinrohextrakt sein, die das entstehende 4-Cumaroyl-CoA entweder unmittelbar weiter umsetzen oder erneut spalten. Eine andere Möglichkeit, dieses Phänomen zu erklären, ist die Anwesenheit weiterer 4CL-Isoformen, die stärker exprimiert werden als die klonierte 4CL-Isoform und Kaffeesäure mit hoher Präferenz umsetzen. Die zweite Erklä-

rung ist allerdings wenig wahrscheinlich, da die 4CL-Aktivität des Proteinrohextraktes insgesamt gering ist.

4.6.3 Expression der RAS

Die RAS gilt nach derzeitigem Ermessen als das charakteristische Enzym des Biosynthesewegs. Da es in Melisse-Zellen lediglich in Form einer einzigen Genkopie vorhanden ist (Abb. 140, Kap. 3.5.6.2), muss die Expression dieses Enzyms unmittelbaren Einfluss auf die Akkumulation der Rosmarinsäure in der Pflanze haben. Expressionsstudien zeigen, dass das Enzym vor allem zwischen dem ersten und fünften Kulturtag exprimiert wird. Dies sind auch die Tage der höchsten Enzymaktivität im Kulturverlauf. Da die Rosmarinsäure-Akkumulation in verschiedenen Zellkulturen sowohl durch erhöhte Saccharose-Konzentrationen des Mediums als auch durch Elicitierung gesteigert werden konnte (Hippolyte et al., 1992; Gertlowski und Petersen, 1993; Szabo et al., 1997), ist es wahrscheinlich, dass dies auch in vermehrter Expression der RAS resultiert. Entsprechende Untersuchungen fanden noch nicht statt, sind allerdings geplant.

4.6.4 Hydroxycinnamoyltransferasen in Pflanzen: Funktion und Evolution

Viele Acyltransferasen, die zur Superfamilie der BAHD-Enzyme zählen, verfügen über mäßige Spezifität gegenüber bestimmten (Hydroxy-)Zimtsäure-Thioestern. Häufig werden von diesen HCT gleichfalls 4-Cumaroyl-CoA und Caffeoil-CoA, in manchen Fällen auch CoA-Ester anderer „Zimtsäuren“, als Hydroxycinnamoyl-Donatoren akzeptiert. Hinsichtlich ihrer Akzeptorsubstrate können diese HCT jedoch in mindestens zwei Gruppen unterteilt werden. Schwerpunkt dieser Betrachtung sollen die beiden Gruppen der Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat/Shikimat Hydroxycinnamoyltransferasen (HCS/QT) beziehungsweise Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferasen (HST) und die Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferasen (RAS) sein.

HCS/QT setzen bevorzugt Chinasäure und Shikimisäure mit den aktivierten CoA-Estern der Hydroxyzimtsäuren um. Eine Präferenz gegenüber China- oder Shikimisäure ist im Einzelfall zu beobachten. Im Gegensatz dazu werden diese beiden Akzeptoren von den bislang bekannten RAS nicht als Reaktionspartner akzeptiert (Petersen et al., 2009). Als Hydroxyphenyllactat-Anteil akzeptieren RAS nur solche Substrate, die über eine freie Hydroxylgruppe in Position 4 des aromatischen Rings verfügen und in R(+)-Konfiguration vorliegen (Petersen, 1991). RAS sind spezifisch für die Biosynthese der Rosmarinsäure und bilden innerhalb der BAHD-Acyltransferase eine eigene, eng verwandte phylogenetische Gruppe (Abb. 127, Kap. 3.5.4).

HCS/QT sind an der Biosynthese der Chlorogensäure, eines Esters aus Kaffeesäure und Chinasäure, beteiligt. Chlorogensäure tritt im Pflanzenreich weit verbreitet auf. Häufig können sowohl Rosmarinsäure als auch Chlorogensäure aus der gleichen Pflanze isoliert werden (Abdullah et al., 2008). Weder in *Coleus blumei* noch in *Melissa officinalis* konnte

In der Darstellung wurden folgende Abkürzungen verwendet: 4CL: Hydroxyzimtsäure: CoA-Ligase; C3H: 4-Cumarat 3-Hydroxylase; CCR: Cinnamoyl-CoA Reduktase; HCT: Hydroxycinnamoyltransferase. (modifiziert nach Hoffmann et al., 2004).

Hoffmann et al. konnten 2003 durch Reinigung, Klonierung und sorgfältige Charakterisierung einer HCS/QT aus *Nicotiana benthamiana* (Solanaceae) (EMBL-Eintrag: AJ507825) einen Weg für die Synthese von Kaffeesäure und Caffeoyl-CoA im Phenylpropanoidstoffwechsel der Pflanzen zeigen. Demzufolge werden in einem ersten Schritt 4-Cumaroyl-CoA und Shikimisäure durch die HCS/QT verestert. Das entstandene Reaktionsprodukt wird durch C3-Hydroxylierung zu Caffeoylshikimat hydroxyliert. Anschlie-

ßend erfolgt, ebenfalls katalysiert durch die HCT, die Rückreaktion, die zur Bildung von Caffeoyl-CoA und Shikimisäure führt. Aus Caffeoyl-CoA kann mithilfe der Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferase (CCoAOMT) Feruloyl-CoA synthetisiert werden, welches für die Synthese der Monolignole benötigt wird. Die Veresterung des durch Coenzym A aktivierten Zimtsäure-Derivates mit Shikimisäure vor der C3-Hydroxylierung ist erforderlich, da C3-Hydroxylasen im Gegensatz zu C4-Hydroxylasen freie Säuren nicht als Substrate akzeptieren. Ein Jahr nach der Entdeckung des neuen Biosynthesewegs konnten Hoffmann und seine Mitarbeiter durch mRNA-Silencing der HCT in verschiedenen Pflanzen die Beteiligung des Enzyms an der Lignin-Synthese belegen (Hoffmann et al., 2004). Diese Ergebnisse machen HCS/QT und HST zu zentralen Enzymen im Metabolismus phenolischer Komponenten (Abb. 147).

Abbildung 146 (Kap. 4.6.1), der Sequenzvergleich verschiedener BAHD-Acyltransferasen, ermöglicht auch den Vergleich der RAS aus *Melissa officinalis* und *Coleus blumei* mit einer HCS/QT aus *Nicotiana tabacum* (in der Abbildung bezeichnet als Nt „HCT“). Bereits in einem ersten Sequenzvergleich der *Coleus*-RAS mit der HCT aus *Nicotiana* fielen eine Deletion von 6 Aminosäuren hinter der Position 222 der RAS-Sequenz und eine längere Insertion zwischen der 239. und 251. Aminosäure auf (Berger et al., 2006). Gerade im letzten Bereich bestehen allerdings auch Unterschiede zwischen den RAS-Sequenzen aus Melisse und Buntnessel. Hierzu zählt auch der Verlust von 3 Aminosäuren in der Sequenz der Melissen-RAS.

Die geplante Kristallisation der RAS wird dabei helfen, den genauen Reaktionsmechanismus und die Struktur der Substrat-Bindetasche aufzuklären. Möglicherweise ist es anschließend sogar möglich, Vorhersagen über die Substratpräferenzen der HCT zu machen wie es durch die Arbeiten von Schneider und ihren Mitarbeitern (2003) bereits in gewissem Umfang für die 4CL möglich geworden ist.

In einem 2009 veröffentlichten Übersichtsartikel zur Rosmarinsäure-Biosynthese (Petersen et al., 2009) wird vom Auftreten unterschiedlicher Aminosäuren im Bereich des HXXXD-Motivs bei RAS- und HCS/QT-Sequenzen berichtet. Diese Beobachtung stützt sich auf die wenigen bislang bekannten RAS-Sequenzen. Die Frage, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen den Aminosäure-Resten der Sequenz in diesem Bereich und den vom Enzym akzeptierten Substraten (Abb. 148) besteht, kann demnächst entweder

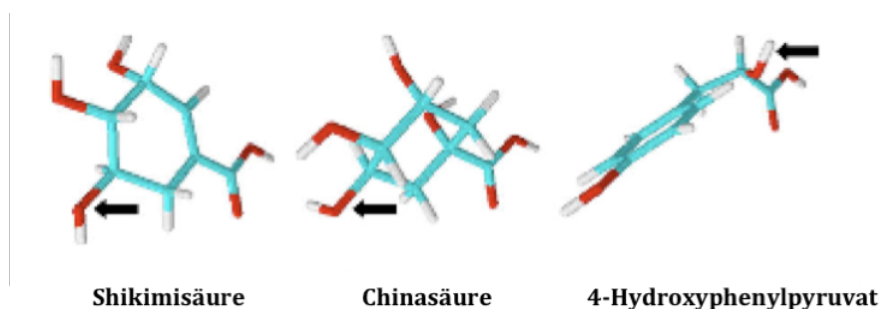


Abb. 148: 3D-Struktur der Akzeptorsubstrate der Hydroxycinnamoyltransferasen.
Die Hydroxylgruppe, welche den 4-Cumarsäure-Anteil akzeptiert ist mit einem Pfeil gekennzeichnet (aus Petersen et al., 2009).

durch die Aufklärung weiterer RAS-cDNAs und systematischen Sequenzvergleich, durch Kristallisation einer HCT oder gezielte Mutationen im Bereich dieser Teilsequenz beantwortet werden.

Hohe Sequenzähnlichkeit zwischen HCS/QT und RAS, die Ähnlichkeit der katalysierten Reaktion und die nahe phylogenetische Verwandtschaft weisen auf einen gemeinsamen Ursprung beider Enzyme hin. Denkbar wäre die Entstehung durch Genduplikation. Nach Zhang (2003) sind zwei Varianten möglich: HCS/QT und RAS könnten aus einem gemeinsamen Vorläufer-Protein hervorgegangen sein, welches in der Lage war, sowohl die Substrate der HCS/QT als auch die Substrate der RAS umzusetzen. Nach der Genduplikation spezialisierten sich die beiden Gene, so dass aus einem Enzym mit breiter Substrat-akzeptanz durch Mutationen im Bereich des aktiven Zentrums zwei Enzyme mit spezifischer Funktion entstanden. In diesem Fall wäre es denkbar, dass das Vorläufer-Protein, abhängig vom Zeitpunkt der Genduplikation, noch in einigen Pflanzenspezies oder -familien erhalten ist. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass das eine Enzym durch Genduplikation aus dem anderen hervorgegangen ist. In diesem Fall wäre es wahrscheinlich, dass die HCS/QT das ältere der beiden Enzyme ist, da es nicht nur im Sekundärmetabolismus, sondern auch an der Synthese von Caffeoyl-CoA, einer Monolignolvorstufe, beteiligt ist.

Noch konnte die RAS-Sequenz nur in wenigen Pflanzen aufgeklärt werden, das heterolog exprimierte Protein wurde lediglich in vier, teilweise sehr nahe verwandten Pflanzen funktionell charakterisiert (*Coleus blumei*, *Coleus forskohlii*, *Melissa officinalis*, *Plectranthus fruticosus*) (Petersen et al., 2009). Zukünftige Untersuchungen zu RAS und HCS/QT werden helfen, sowohl Licht auf die Evolution der HCT als auch auf die Evolution der Rosmarinsäure-Biosynthese zu werfen.

Wie zuvor angedeutet, wird der Ursprung der BAHD-Acyltransferasen in den CAT gesehen (D'Auria, 2006). Gemeinsames Merkmal der Mitglieder dieser Superfamilie ist neben den beiden konservierten Motiven ein „Q-Intron“. Dieses befindet sich hoch konserviert hinter einem konservierten Glutamin (Q) etwa 17 Aminosäurereste vor dem HXXXD-Motiv der Substratbindetasche (Abb. 146). Diese Strukturkonservierung auf genomischer Ebene stützt die Annahme eines gemeinsamen evolutionären Vorfahrens (St. Pierre und De Luca, 2000). Leider gelang es nicht, mit den RAS-Volllängenprimern der Melisse auch die genomische Sequenz des Enzyms zu amplifizieren und aufzuklären. Die genomische RAS-Sequenz aus *Coleus blumei* zeigt dieses typische Q-Intron (Petersen et al., 2009).

4.7 Rosmarinsäure-Biosynthese: Zusammenfassung und Ausblick

Bis heute wurde die Rosmarinsäure in phylogenetisch weit entfernten Familien nachgewiesen. Ob dies auf unabhängige Entwicklung oder frühes evolutionäres Auftreten des Biosynthesewegs zurück zu führen ist, ist derzeit nicht bekannt. Dass sich diese beiden Möglichkeiten nicht immer gegenseitig ausschließen müssen, konnten Ober und Hart-

mann (2000) für die Evolution der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese zeigen. Ein phylogenetischer Vergleich der Rosmarinsäure Synthase (RAS)-Sequenzen möglichst vieler Pflanzen soll zur Beantwortung dieser Frage beitragen. Entsprechende Forschungstätigkeiten finden statt. Die Aufklärung der RAS-cDNA-Sequenz der Melisse und die Ermittlung ihrer kinetischen Parameter werden wie der Nachweis einer einzigen RAS-Genkopie dabei helfen, diese Frage zu beantworten.

Die Untersuchung des Rosmarinsäure-Biosynthesewegs jedoch auf dieses Enzym zu beschränken wäre kurzsichtig. Wie bereits zuvor erwähnt, handelt es sich bei der Rosmarinsäure um einen Abwehrstoff der Pflanzen, dessen Synthese durch Elicitierung gesteigert werden kann. Akkumulation eines Stoffes nach Elicitierung kann nur erfolgen, sofern nicht nur für die hochspezifische RAS sondern auch für alle übrigen am Biosyntheseweg beteiligten Enzyme Edukte in ausreichender Konzentration zur Verfügung stehen und in der Pflanzenzelle Bedingungen vorherrschen, die diese Enzymaktivitäten begünstigen. Schlüsselpositionen könnten neben der RAS insbesondere auch die 4CL als letztes Enzym des allgemeinen Phenylpropanoidstoffwechsels, die TAT und die HPPR einnehmen.

Obgleich die 4CL als Enzym des Phenylpropanstoffwechsels bereits in vielen Pflanzen ausgiebig erforscht wurde, konnte bislang nicht geklärt werden, ob ihre Isoformen durch die teilweise hohe Substratspezifität und/oder die denkbare Bildung von Multienzymkomplexen (Kumar und Ellis, 2003) gezielten Einfluss auf die Synthese bestimmter Sekundärmetabolite ausüben. Promotorregionen hoher Sequenzähnlichkeit sollen für die koordinierte Expression der PAL, C4H und 4CL verantwortlich sein (Logemann et al., 1995). Im Genom der Melisse treten mindestens zwei Genkopien der 4CL auf. Eine dieser Genkopien konnte nicht nur sequenziert, sondern auch als cDNA kloniert und nach Expression in *E. coli* charakterisiert werden. Bei dieser Genkopie handelt es sich um eine 4CL der phylogenetisch jüngeren Klasse I, deren mRNA-Expressionslevel und Substratpräferenzen auf eine Beteiligung an der Rosmarinsäure-Biosynthese hinweisen.

Untersuchungen zur Rolle der TAT im Metabolismus der Pflanzen stehen am Anfang. Im Primärstoffwechsel ist die Beteiligung des Enzyms in der Biosynthese der Tocopherole und Plastochinone bekannt, seine Elicitierbarkeit wird untersucht (Lopukhina et al., 2001; Sandorf und Holländer-Czytko, 2002). In Zusammenhang mit der Rosmarinsäure-Biosynthese konnten die Aufgabe der verschiedenen TAT-Isoformen in Rosmarinsäureproduzierenden Zellkulturen von *Anchusa officinalis* (De-Eknamkul und Ellis, 1987a+b; Mizukami und Ellis, 1991) näher beschrieben werden. Diese weisen darauf hin, dass Isoformen existieren können, die spezifisch am Sekundärmetabolismus beteiligt sind.

Nach erfolgreicher Klonierung und Charakterisierung einer Melissen-TAT wird es möglich sein, das bisherige Wissen über die Funktionen dieses Enzyms im Stoffwechsel der Pflanzen zu erweitern. Zu diesem Zweck sollten Anwesenheit und Expression möglicher Isoformen, Expressionsprofile unter verschiedenen Kulturbedingungen und Regulation der Expression auf Genebene zukünftig genauer studiert werden.

Noch ungeklärt ist die Frage, ob die HPPR ein spezifisches Enzym im Biosyntheseweg der Rosmarinsäure ist. Die in *Coleus*- und Melissen-Kulturen bestimmten Enzymaktivitäten, Substratpräferenzen und Expressionsprofile weisen auf die Existenz eines spezifischen Enzyms hin. Andererseits deuten Sequenz und kinetische Parameter des von Kim et al. (2007) und Janiak (2007) untersuchten Gens/Enzyms darauf hin, dass die Reduktion des Hydroxyphenylpyruvats zum entsprechenden Lactat auch durch ein Enzym des Primärstoffwechsels, genauer der Photorespiration, katalysiert sein könnte. Untersuchungen, die zur Beantwortung dieser Frage beitragen sollen, finden derzeit an Wurzelkulturen der amphitetraploiden Pflanze *Coleus blumei* statt. Sinnvoll wäre es, die Untersuchungen in diploiden Melissenzellen zu wiederholen, da die Zahl möglicher Genkopien in diploiden Chromosomensätzen leichter zu ermitteln und ihr Einfluss auf das Ergebnis besser abschätzbar ist.

Diese Arbeit lässt zwei Enzyme des Rosmarinsäure-Biosynthesewegs völlig außer acht: 3- und 3'-Hydroxylasen, die die durch Reaktion der Rosmarinsäure Synthase entstandenen Ester in zwei letzten Schritten zu Rosmarinsäure umsetzen. Von diesen beiden Hydroxylasen, die zur Familie der Cytochrom P450-Familie zählen, konnte eine, CYP98A14 (EMBL-Eintrag: AJ427452) (Eberle et al., 2009), aus *Coleus blumei* kloniert werden. Das Enzym katalysiert sowohl die 3-Hydroxylierung von 4-Cumaroyl-DHPL als auch zu einem geringeren Umfang die 3'-Hydroxylierung von Caffeoyl-pHPL, wohingegen 4-Cumaroylshikimat und -chinat nicht als Substrat akzeptiert werden. Obwohl dieses Enzym in der Lage ist, beide Hydroxylierungen durchzuführen, weisen Untersuchungen mit Mikrosomenpräparaten aus *Coleus*-Suspensionskulturzellen und die vorhandene Substratpräferenz des klonierten Enzyms auf die Beteiligung zweier Cytochrom P450-Enzyme an den Hydroxylierungen hin (Petersen, 1997; Eberle et al., 2009).

Zwischen den CYP98A, die spezifisch für die Rosmarinsäure-Biosynthese sind und solchen, die an der Biosynthese von Chlorogensäure oder Caffeoylshikimat beteiligt sind, konnten hohe Sequenzähnlichkeiten beobachtet werden. Diese bestehen auch zu CYP98A, die neben den Substraten der Rosmarinsäure-Biosynthese auch diejenigen der Chlorogensäure/Caffeoylshikimat-Biosynthese akzeptieren (Petersen et al., 2009). Obgleich es mit den derzeitigen bekannten Daten noch nicht möglich ist, Aussagen über die evolutionäre Entstehung der CYP98A zu machen, werden zukünftige Untersuchungen sicherlich zur Beantwortung dieser Frage beitragen. Aus diesem Grund ist es erforderlich, die 3- und 3'-Hydroxylasen in Melissen-Suspensionskulturen zukünftig genauer zu untersuchen und in die Experimente zur Regulation der Rosmarinsäure-Biosynthese mit einzubeziehen.

Die *Melissa officinalis*-Suspensionskultur ist in der Lage, in kurzen Kulturperioden bei (meist) gut messbaren Enzymaktivitäten große Mengen Rosmarinsäure zu akkumulieren. Diese Fähigkeit bleibt, wie eine erneute Charakterisierung der Kultur etwa drei Jahre nach Beginn der Arbeit gezeigt hat, über viele Jahre ohne merkliche Beeinträchtigung erhalten. Dies macht die Melissen-Suspensionskultur zu einem guten Studienobjekt für die Rosmarinsäure-Biosynthese. Vorteilhaft ist zudem der diploide Chromosomensatz,

der es ermöglicht, auch bei Regulationsstudien auf genomischer Ebene einen Überblick über den Einfluss einzelner Genkopien auf das Ergebnis zu erhalten.

In dieser Arbeit wurden die Enzyme PAL, C4H, 4CL, TAT, HPPR und RAS charakterisiert. Die cDNA-Volllängen der Enzyme PAL, 4CL und RAS konnten aufgeklärt, ihre kinetischen Parameter nach Expression in *E. coli* bestimmt werden. Auch die genomischen Sequenzen von PAL und 4CL sind mittlerweile bekannt. Durch Southern Blot-Analyse mit DIG-markierten Sonden wurden ferner zwei Genkopien der PAL und 4CL und eine Genkopie der RAS im Genom der *Melissa officinalis*-Suspensionskulturzellen nachgewiesen. Noch unvollständig ist eine cDNA mit hoher Sequenzähnlichkeit zu TAT-Sequenzen der Datenbank.

Diese Ergebnisse bilden einerseits eine gute Basis für die Untersuchung der Rosmarinsäure-Biosynthese auf genomischer Ebene, werden andererseits aber auch dazu beitragen können, mehr über die Funktion und Evolution der Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels und der Tyrosin Aminotransferase im Metabolismus der Pflanzen zu erfahren. Möglicherweise kann mithilfe der *Melissa officinalis*-Suspensionskultur zukünftig auch die Frage beantwortet werden, welche Enzyme tatsächlich spezifisch für den Rosmarinsäure-Biosyntheseweg sind.

5 Zusammenfassung

Die an der Rosmarinsäure-Biosynthese beteiligten Enzyme konnten bereits in Zellkulturen von *Coleus blumei* und verschiedenen Lamiaceen und Boraginaceen identifiziert und charakterisiert werden. Dennoch ist bislang wenig über die Regulationsmechanismen des Biosynthesewegs auf genomischer Ebene bekannt. Diese Arbeit sollte durch genaue Untersuchung der Rosmarinsäure-Biosynthese in einer diploiden *Melissa officinalis*-Suspensionskultur die Grundlage für die Aufklärung regulatorischer Mechanismen legen. Zu diesem Zweck waren eine genaue Charakterisierung der Zellkultur und die Charakterisierung der an der Biosynthese beteiligten Enzyme sowohl im Proteinrohextrakt als auch nach Klonierung und heterologer Expression in *E. coli* erforderlich.

Rosmarinsäure, Hauptbestandteil der sogenannten Labiatengerbstoffe, ist ein Ester aus Kaffeesäure und 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure, der im Pflanzenreich weit verbreitet anzutreffen ist. Für die Pflanzen erfüllt er vermutlich die Rolle eines konstitutiv gebildeten Abwehrstoffes zum Schutz vor Fraßfeinden. Die Biosynthese geht von den beiden Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin aus. Diese werden nach enzymatischer Umwandlung zu 4-Cumaroyl-CoA und 4-Hydroxyphenyllactat durch die Rosmarinsäure Synthase, einer Acyltransferase aus der Familie der BAHD-Enzyme, miteinander verestert und das Reaktionsprodukt durch anschließende 3- und 3'-Hydroxylierung zu Rosmarinsäure umgesetzt.

Suspensionskulturen der Melisse sind in der Lage in kurzen Kulturperioden in Abhängigkeit vom Saccharosegehalt des Mediums bezogen auf das Zelltrockengewicht bis zu 7 % Rosmarinsäure zu akkumulieren (in Medium mit 4 % Saccharose). Durch Zugabe von Methyljasmonat ist eine weitere Steigerung möglich.

Die Umwandlung des L-Phenylalanins zum Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester erfolgt durch die Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels: Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL), Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) und Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4CL). Zusätzlich zur detaillierten Charakterisierung der nativen Enzyme gelangen Klonierung und Charakterisierung je einer PAL- und 4CL-Isoform. Für beide Enzyme konnte durch Southern Blotting die Existenz zweier Genkopien nachgewiesen werden. mRNA-Expressionsprofile, die sowohl für die PAL- als auch für die 4CL über einen Kultivierungszeitraum von 10 Tagen in Medium mit 2 % Saccharose erstellt wurden, weisen auf eine mögliche Beteiligung der klonierten Isoformen an der Rosmarinsäure-Biosynthese hin. Mithilfe der zur Klonierung verwendeten Vollängenprimer war es außerdem möglich, die genomischen Sequenzen beider Enzyme aufzuklären. Die genomische Sequenz der PAL weist ein charakteristisches Intron auf, welches in den PAL-Sequenzen der Angiospermen in einer konservierten Position zu finden ist. Die genomische Sequenz der klonierten 4CL ist hingegen Intron-frei.

Katalysiert durch die Tyrosin Aminotransferase (TAT) wird L-Tyrosin zunächst in 4-Hydroxyphenylpyruvat umgewandelt. Die im Proteinrohextrakt aus Melissen-Suspensionskulturen ermittelten kinetischen Parameter korrelieren gut mit den Werten die bereits zuvor für das Enzym in Pflanzen (*Coleus blumei*, *Anchusa officinalis*), Säugetieren (Ratte) oder Protozoen (*Trypanosoma cruzi*) bestimmt wurden. Mithilfe der RACE-PCR konnte eine cDNA-Teilsequenz aufgeklärt werden, die große Übereinstimmung mit anderen TAT-Sequenzen aufweist.

Durch ein weiteres Enzym, die sogenannte Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR) wird das 4-Hydroxyphenylpyruvat zum Lactat reduziert. Die in *Coleus blumei*-Proteinrohextrakten ermittelten Substratpräferenzen dieses Enzyms konnten für das native Enzym aus *Melissa officinalis* bestätigt werden. Auch im Proteinrohextrakt aus Melissen-Suspensionskulturen wurde für 4-Hydroxyphenylpyruvat ein niedrigerer apparenter K_m -Wert als für 3,4-Dihydroxyphenyllactat (5 $\mu\text{mol/l}$ respektive 28 $\mu\text{mol/l}$) und für NADPH ein niedrigerer Wert als für NADH ermittelt (58 $\mu\text{mol/l}$ respektive 90 $\mu\text{mol/l}$). Noch ungeklärt ist die Frage, ob es sich bei der HPPR um ein spezifisches Enzym des Rosmarinsäure-Biosynthesewegs handelt oder ob die Reaktion durch ein Enzym der Photorespiration, die cytosolische Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPR), katalysiert wird.

Die Rosmarinsäure Synthase (RAS) verestert die mit Coenzym A aktivierten (Hydroxy-) Zimtsäuren mit den Produkten der HPPR. Da die bislang bekannten RAS, die aus zwei *Coleus*-Arten, *Plectranthus fruticosus* und *Melissa officinalis* kloniert werden konnten, lediglich 4-Hydroxyphenyllactat und 3,4-Dihydroxyphenyllactat jedoch weder Chinasäure noch Shikimisäure als Akzeptorsubstrate akzeptieren, gilt dieses Enzym als das möglicherweise einzige spezifische Enzym des Biosynthesewegs. Im Genom der Melisse konnte durch Southern Blotting nur eine RAS-Genkopie nachgewiesen werden.

6 Summary

The enzymes that take part in rosmarinic acid biosynthesis could be identified and characterized in cell cultures of *Coleus blumei* and several other species of the Lamiaceae and Boraginaceae. But there is still little known about the regulation of the biosynthetic pathway on genomic level. This work aimed to provide a detailed investigation of the biosynthesis of rosmarinic acid in a diploid suspension culture of *Melissa officinalis* L. for future investigations into these regulatory mechanisms. For this purpose a thorough characterization of the cell culture was necessary. Additionally a detailed characterization of the enzymes involved in the rosmarinic acid biosynthesis both in the crude extract and after cloning and heterologous expression in *E. coli* was performed.

Rosmarinic acid, the main component of the so called “Labiatergerbstoffe”, is an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyllactic acid that can be found wide spread in the plant kingdom. In plants, rosmarinic acid is supposed to act as a preformed constitutively accumulated defence compound. The biosynthesis starts with the amino acids L-phenylalanine and L-tyrosine. After enzymatic conversion to 4-coumaric acid and 4-hydroxyphenyllactic acid they are esterified by rosmarinic acid synthase, an enzyme belonging to the superfamily of BAHD acyltransferases. Finally the reaction product is converted to rosmarinic acid by 3- and 3'-hydroxylases.

During short culture periods suspension cultures of *Melissa officinalis* are able to accumulate rosmarinic acid up to 7 % of the dry weight in medium with 4 % sucrose. After elicitation with methyl jasmonate a further increase is possible.

The transformation of L-phenylalanine to CoA-esters of hydroxycinnamic acid is catalyzed by the enzymes of the general phenylpropanoid pathway: phenylalanine ammonia-lyase (PAL), cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) and 4-coumaric acid CoA-ligase (4CL). In addition to the characterization of the native enzymes a successful cloning and characterization of a PAL- and a 4CL-isoform took place. Southern blot analysis of both enzymes revealed two gene copies of each enzyme in the genome. According to the mRNA expression profiles the cloned isoforms may be involved in rosmarinic acid biosynthesis. By using the full-length primers it was also possible to determine the genomic sequence of both enzymes. The genomic sequence of PAL contains a characteristic intron that can be found in a conserved position in the genomic sequences of all known PAL-sequences of angiosperms. In contrast to this the genomic sequence of the cloned 4CL is free of introns.

L-Tyrosine is transformed to 4-hydroxyphenylpyruvate catalyzed by tyrosine aminotransferase (TAT). The kinetic parameter of the TAT in the crude extract of suspension cultures of lemon balm correlated well with the data determined for the enzyme in other plants (*Coleus blumei*, *Anchusa officinalis*), mammals (rat), or protozoa (*Trypanosoma*

cruzi). Using the method of RACE-PCR a partial cDNA could be identified that showed high similarity to other TAT sequences.

The reduction of 4-hydroxyphenylpyruvic acid to the corresponding lactate is catalyzed by hydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR). The substrate preference of the native enzyme is comparable, both in the crude extract of *Coleus blumei* and *Melissa officinalis* suspension cultures: 4-hydroxyphenylpyruvic acid (5 $\mu\text{mol/l}$) is preferred over 3,4-dihydroxyphenylpyruvic acid (28 $\mu\text{mol/l}$) and the apparent K_m -value for NADPH (58 $\mu\text{mol/l}$) is lower than the one for NADH (90 $\mu\text{mol/l}$). It is still unknown whether HPPR is a specific enzyme of rosmarinic acid biosynthesis. It could also be possible that the reaction is catalyzed by an enzyme of the photorespiratory pathway, namely cytosolic hydroxypyruvate reductase (HPR).

Rosmarinic acid synthase (RAS) catalyzes the esterification of the coenzyme A activated (hydroxy-)cinnamic acid with the reaction product of HPPR. Up to now only four RAS-cDNAs could be cloned and characterized after heterologous expression in *E. coli*. The cDNAs were isolated from two different *Coleus* species, *Plectranthus fruticosus* and *Melissa officinalis*. As acceptor substrates they accept only 4-hydroxyphenyllactic acid, and 3,4-dihydroxyphenyllactic acid, but neither quinic acid nor shikimic acid. Because of this high substrate specificity RAS is supposed to be a specific enzyme of this biosynthetic pathway. According to the results of Southern blot analysis there is only one copy of RAS in the genome of lemon balm.

7 Referenzen

- Abdullah Y, Schneider B, Petersen M (2008).** Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. *Phytochem. Lett.* 1: 199-203
- Achamlale S, Rezzonico B, Grignon-Dubois M (2009).** Rosmarinic acid from beach waste: isolation and HPLC quantification in *Zostera detritus* from arcachon lagoon. *Food Chem.* 113: 878-883
- Alfermann AW, Petersen M (1995).** Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 43: 199-205
- Amzad Hossain M, Salehuddin SM, Kabir MJ, Rahman SMM, Vasantha Rupasinghe HP (2009).** Sinensetin, 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of the skin of apple fruit. *Food Chem.* 113: 185-190
- Andrade Furtado M, Caetano Fernandes L, de Almeida F, Andrade Furtado R, Cunha WR, Crispim Tavares D (2008).** Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutat. Res.* 657: 150-154
- Aoki K, Yano K, Suzuki A, Suda K, Suzuki T, Sakurai N, Suzuki H, Takahashi H, Watanabe Y, Arie T, Ichinose Y, Kodama M, Ezura H, Shibata D (2009).** Full-length cDNA from tomato (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom) leaves treated with pathogens. Published online.
- Appert C, Logemann E, Hahlbrock K, Schmid J, Amrhein N (1994).** Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *Eur. J. Biochem.* 225: 491-499
- Aquino R, Ciavatta ML, De Simone F, Pizza C (1990).** A flavanone glycoside from *Hamelia patens*. *Phytochemistry* 29: 2358-2360
- Aquino R, Morelli S, Lauro MR, Abdo S, Saija A, Tomaino A (2001).** Phenolic constituents and antioxidant activity of an extract of *Anthurium versicolor* leaves. *J. Nat. Prod.* 64: 1019-1023
- Babulka P (2005).** La mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Phytotherapie* 3: 114-117
- Baedeker M, Schulz GE (2002).** Autocatalytic peptide cyclization during chain folding of histidine ammonia-lyase. *Structure* 10: 61-67
- Bayer A, Ma XY, Stockigt J (2004).** Acetyltransfer in natural product biosynthesis - functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 2787-2795
- Becker-André M, Schulze-Lefert P, Hahlbrock K (1991).** Structural comparison, modes of expression, and putative *cis*-acting elements of the two 4-coumarate:CoA ligase genes in potato. *J. Biol. Chem.* 266: 8551-8559
- Bennet TP (1967).** Membrane filtration for determining protein in the presence of interfering substances. *Nature* 18: 1131-1132
- Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL (2007).** *Biochemie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Berger A, Meinhard J, Petersen M (2006).** Rosmarinic acid synthase is a new member of the superfamily of BAHD acyltransferases. *Planta* 224: 1503-1510

- Bertani G (1951).** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichi coli*. J. Bacteriol. 62: 293-300
- Birnboim HC, Doly J (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research 7: 1513-1523
- Bohm BA (1968).** Phenolic compounds in ferns – III. An examination of some ferns for caffeic acid derivatives. Phytochemistry 7: 1825-1830
- Booth MPS, Connors R, Rumsby G, Brady RL (2006).** Structural basis of substrate specificity in human glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase. J. Mol. Biol. 360: 178-189
- Bourgau F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001).** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161: 839-851
- Bradford MM (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Bioch. 72: 248-254
- Bresinsky A, Körner C, Kadereit JW, Neuhaus G, Sonnewald U (2008).** Strasburger – Lehrbuch der Botanik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL (1998).** The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. Pharm. Acta Helv. 72: 301-305
- Chang A, Lim MH, Lee SW, Robb EJ, Nazar RN (2008).** Tomato phenylalanine ammonia-lyase gene family, highly redundant but strongly underutilized. J. Biol. Chem. 283: 33591-33601
- Chen I, Dubnau D (2004).** DNA uptake during bacterial transformation. Nat. Rev. Microbiol. 2: 241-249
- Chomczynski P, Sacchi N (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159
- Clark JM, Joyce CM, Beardsley GP (1987).** Novel blunt-end addition reactions catalyzed by DNA polymerase I of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 198: 123-127
- Cochrane FC, Davin LB, Lewis NG (2004).** The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. Phytochemistry 65: 1557-1564
- Compton SJ, Jones CG (1985).** Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Anal. Biochem. 151: 369-374
- Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA, Brick P (1997).** Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. EMBO J. 16: 4174-4183
- Cooper TG (1981).** Biochemische Arbeitsmethoden. Verlag de Gruyter, Berlin
- Cramer CL, Edwards K, Dron M, Liang X, Dildine SL, Bolwell GP, Dixon RA, Lamb CJ, Schuch W (1989).** Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. Plant Mol. Biol. 12: 367-383
- Cukovic D, Ehtling J, VanZiffle JA, Douglas CJ (2001).** Structure and evolution of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene families. Biol. Chem. 382: 645-654
- D'Auria JC (2006).** Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. Curr. Opin. Plant Biol. 9: 331-340
- De Tommasi N, De Simone F, De Feo V, Pizza C (1991).** Phenylpropanoid glycosides and rosmarinic acid from *Momordica balsamina*. Planta Med. 57: 201
- De-Eknamkul W, Ellis BE (1987a).** Tyrosine aminotransferase: The entrypoint enzyme of the tyrosine derived pathway in rosmarinic acid biosynthesis. Phytochemistry 26: 1941-1946

- De-Eknamkul W, Ellis BE (1987b).** Purification and characterization of tyrosine aminotransferase activities from *Anchusa officinalis* cell cultures. Arch. Biochem. Biophys. 257: 430-438
- Dixon RA, Paiva NL (1995).** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell 7: 1085-1097
- Eberle D, Ullmann P, Werck-Reichhart D, Petersen M (2009).** cDNA cloning and functional characterisation of CYP98A14 and NADPH:cytochrome P450 reductase from *Coleus blumei* involved in rosmarinic acid biosynthesis. Plant Mol. Biol. 69: 239-253
- Ellis BE, Towers GHN (1970).** Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. Biochem. J. 118: 291-297
- Ehlting J, Büttner D, Wang Q, Douglas CJ, Somssich IE, Kombrink E (1999).** Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionary divergent classes in angiosperms. Plant J. 19: 9-20
- Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Müller G (1993).** Reduction of background problems in nonradioactive northern and southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. Anal. Biochem. 210: 235-244
- Fernandez L, Martin T, Villaescusa L, Bartholome C, Rubio B, Diaz AM (1995).** Rosmarinic acid and iridoids of *Scrophularia scorodonia* L. Colloques – Institut National de la Recherche Agronomique 69: 307-308
- Fiedler E, Soll J, Schultz G (1982).** The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. Planta 155: 511-515
- Freeman GG, Whenham RJ, Mackenzie IA, Davey MR (1974).** Flavour components in tissue cultures of onion (*Allium cepa* L.). Plant Science Lett. 3: 121-125
- Frohmann MA (1993).** Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. Methods Enzymol. 218: 340-356
- Frohmann MA (1994).** On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). Genome Res. 4: 40-58
- Fujita Y, Takahashi S, Yamada Y (1984a).** Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives through protoplasts of *Lithospermum erythrorhizon*. Agricul. Biol. Chem. 49: 1755-1759
- Fulda M, Heinz E, Wolter FP (1993).** The *fadD* gene of *Escherichia coli* K12 is located close to *rnd* 39.6 min of the chromosomal map and is a new member of the AMP-binding protein family. Mol. Gen. Genet. 242: 241-249
- Gautheret RJ (1939).** Action du saccharose sur la croissance des tissus de carotte. C. R. Acad. Sci., Paris 208: 118-120
- Gertlowski C, Petersen M (1993).** Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 34: 183-190
- Grant GA (1989).** A new family of 2-hydroxyacid dehydrogenases. Biochem. Biophys. Res. Comm. 165: 1371-1374
- Grisebach H, Hahlbrock K (1977).** Pflanzliche Zellkulturen zur Aufklärung von Biosynthesewegen. Biologie in unserer Zeit 7: 170-177
- Guo J, Wang MH (2009).** Characterization of the phenylalanine ammonia-lyase gene (*SIPAL5*) from tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Mol. Biol. Rep. 36: 1579-1585
- Haberlandt G (1902).** Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsberichte Math. Naturw. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien 111: 69-92

- Häusler E, Petersen M, Alfermann AW (1991).** Hydroxyphenylpyruvate reductase from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth. Z. Naturforsch 46c: 371-376
- Häusler E, Petersen M, Alfermann AW (1992).** Rosmarinsäure in *Blechnum*-spezies. In: Haschke, HP, Schnarrenberger C (Eds.), Botanikertagung 1992 Berlin. Akademie-Verlag, Berlin, S. 507
- Hamberger B, Hahlbrock K (2004).** The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 2209-2214
- Harborne JB (1966).** Caffeic acid ester distribution in higher plants. Z. Naturforsch. 21b: 604-605
- Hayashi S, Granner DK, Tomkins GM (1967).** Tyrosine aminotransferase. Purification and characterization. J. Biol. Chem. 242: 3998-4006
- Hermann K (1960).** Über die antioxidative Wirkung der Labiatendrogen und der in ihnen enthaltenen Labiatensäure („Labiatergerbstoff“). Z. Lebens. Unters. Forsch. 116: 224-228
- Hiller K (1965).** Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoidae. 1. Mitteilung: *Sanicula europaea* L. – Isolierung und quantitative Erfassung von Chlorogen- und Rosmarinsäure. Pharmazie 20: 574-579
- Hiller K, Kothe N (1967).** Chlorogen- und Rosmarinsäure – Vorkommen und quantitative Verteilung in Pflanzen der Saniculoideae. Pharmazie 22: 220-221
- Hippolyte I, Marin B, Jonard R (1992).** Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. Plant Cell Reports 11: 109-112
- Ho LK, Chang CR, Chang YS (1995).** Chemical components from *Triumfetta bartramia*. J. Chin. Chem. Soc. (Taipei) 42: 93-95
- Hochuli E, Döbeli H, Schacher A (1987).** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. J. Chromatogr. 411: 177-184
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2004).** Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell 16: 1446-1465
- Hoffmann L, Maury S, Marzt F, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2003).** Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. J. Biol. Chem. 278: 95-103
- Holzmannová V (1995).** Kyselina rosmarinová a její biologická aktivita. Chem. Listy 90: 486-496
- Hornbrecher A (2005).** Molecular Modelling Studien am humanen Cytochrom P450 1A2. Cuvillier Verlag.
- Hu WJ, Kawaoka A, Tsai CJ, Lung J, Osakabe K, Ebinuma H, Chiang VL (1998).** Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:Co Aligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5407-5412
- Huang B, Yi B, Duan Y, Sun L, Yu X, Guo J, Chen W (2008).** Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen) in rosmarinic acid biosynthesis pathway. Mol. Biol. Rep. 35: 601-612
- Huang HL, Li DL, Xu B, Wang BG (2007).** Antioxidative principles of *Jussiaea repens*: an edible medicinale plant. Int. J. Food Sci. Technol. 42: 1219-1227
- Hübner S, Hehmann M, Schreiner S, Martens S, Lukacin R, Matern U (2003).** Functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from *Ammi majus* L. Phytochemistry 64: 445-452

- Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD (1988).** DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9436-9440
- Iwasaki Y, Lamar C, Danenberg K, Pitot HC (1973).** Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. Eur. J. Bioch. 34: 347-357
- Jacob F, Monod J (1961).** Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3: 318-356
- Janiak VD (2007).** Charakterisierung und Struktur einer Hydroxy(phenyl)pyruvat Reduktase aus *Coleus blumei*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- Janicsák G, Máthé I, Miklóssy-Vári V, Blunden G (1999).** Comparative studies of the rosmarinic acid and caffeic contents of Lamiaceae species. Biochem. Syst. Ecol. 27: 733-738
- Joos HJ, Hahlbrock K (1992).** Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression. Eur. J. Biochem. 204: 621-629
- Karwatzki B, Petersen M, Alfermann AW (1989).** Transient activity of enzymes involved in the biosynthesis of rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei*. Planta Med. 55: 663-664
- Kelley CJ, Mahajan JR, Brooks LC, Neubert LA, Breneman WR, Carmack M (1975).** Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderae* Dougl. ex Lehm. (Boraginaceae). 1. Isolation and structure determination of lithospermic acid. J. Org. Chem. 40: 1804-1815
- Kempin B (1994).** Untersuchungen zur Rosmarinsäuresynthese in Suspensionskulturen von *Coleus blumei*: Tyrosin Aminotransferase. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, Kawagashira N, Doi K, Kishimoto N, Yzakai J, Ishikawa M, et al., Rice full-length cDNA consortium (2003).** Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. Science 301: 376-379
- Kim BR, Nam HY, Kim SU, Kim SI, Chang YJ (2003).** Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. Biotechnol. Lett. 25: 1869-1871
- Kim KH, Janiak V, Petersen M (2004).** Purification, cloning and functional expression of hydroxyphenylpyruvate reductase involved in rosmarinic acid biosynthesis in cell cultures of *Coleus blumei*. Plant Mol. Biol. 54: 311-323
- Knobloch KH, Hahlbrock K (1975).** Isoenzymes of *p*-coumarate:CoA-ligase from cell suspensions of *Glycine max*. Eur. J. Biochem. 52: 311-320
- Knobloch KH, Hahlbrook K (1977).** 4-Coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm. Arch. Biochem. Biophys. 184: 237-248
- Kochhar S, Hunziker PE, Leong-Morgenthaler P, Hottinger H (1992).** Primary structure, physicochemical properties, and chemical modification of NAD⁺-dependent D-lactate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 267: 8499-85
- Koch-Heitzmann I, Schultze W (1988).** 2000 Jahre *Melissa officinalis*. Von der Bienenpflanze zum Virustatikum. Z. Phytother. 9, 77 – 85
- Koch-Heitzmann I, Schultze W (1984).** *Melissa officinalis* L. an old medicinal plant with new therapeutic actions. Dtsch. Apothek. Ztg. 124, 2137 – 2145
- Koopmann E, Logemann E, Hahlbrock K (1999).** Regulation and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from parsley. Plant Physiol. 119: 49-55

- Koukol J, Conn EE (1961).** The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV: Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. J. Biol. Chem. 236: 2692-2698
- Kowalczyk A (1996).** HPLC analysis of polyphenolic compounds in *Knautia arvensis* Coult. Beitr. Züchtungsforsch. 2: 389-392
- Kumar A, Ellis BE (2001).** The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. Plant Physiol. 127: 230-239
- Kumar A, Ellis BE (2003).** 4-Coumarate:CoA ligase gene family in *Rubus idaeus*: cDNA structures, evolution, and expression. Plant Mol. Biol. 31: 327-340
- Kumar S, Dudley J, Nei M, Tamura K (2008).** MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief. Bioinform. 9: 299-306
- Kurkin VA, Kurkina TV, Zapesochaya GG, Avdeeca EV, Bogolyubova ZhV, Vandyshev VV, Chikina IYu (1995).** Chemical investigation of the herbage of *Melissa officinalis*. Chem. Nat. Compd. 31: 266-267
- Kusumawati L, Imin N, Djordjevic MA (2008).** Characterization of the secretome of suspension cultures of Medicago species reveals proteins important for defense and development. J. Proteome Res. 7: 4508-4520
- Kyndt JA, Meyer TE, Cusanovich MA, Van Beeumen JJ (2002).** Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. FEBS Lett. 512: 240-244
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Lamzin VS, Dauter Z, Popov VO, Harutyunyan EH, Wilson KS (1994).** High resolution structures of holo and apo formate dehydrogenase. J. Mol. Biol. 236: 759-785
- Landmann C, Schwab W.** Cloning of alcohol acyltransferases from *Lavandula angustifolia*. Unveröffentlicht.
- Langer B, Röther D, Rétey J (1997).** Identification of essential amino acids in phenylalanine ammonia-lyase by site-directed mutagenesis. Biochemistry 36: 10867-10871
- Lasure A, Van Poel B, Pieters L, Claeys M, Gupta M, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ (1994).** Complement-inhibiting properties of *Apeiba tibourbou*. Planta Med. 60: 276-277
- Le Claire E, Schwaiger S, Banaigs B, Stuppner H, Gafner F (2005).** Distribution of a new rosmarinic acid derivative in *Eryngium alpinum* L. and other Apiaceae. J. Agric. Food Chem. 53: 4367-4372
- Lee D, Douglas CJ (1996).** Two divergent members of a tobacco 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene family. Plant Physiol. 112: 193-205
- Lee KH, Yang MC, Kim KH, Kwon HC, Choi SU, Lee KR (2008).** A new phenolic amide from the roots of *Paris verticillata*. Molecules 13: 41-45
- Lee SW, Robb J, Nazar RN (1992).** Truncated phenylalanine ammonia-lyase expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*). J. Biol. Chem. 267: 11824-11830
- Liang X, Dron M, Cramer CL, Dixon RA, Lamb CJ (1989).** Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. J. Biol. Chem. 264: 14486-14492
- Lindermayr C, Möllers B, Fliegmann J, Uhlmann A, Lottspeich F, Meimberg H, Ebel J (2002).** Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family. Eur. J. Biochem. 269: 1304-1315

- Litvinenko VI, Popova TP, Simonjan AV, Zoz IG, Sokolov VS (1975).** „Gerbstoffe“ und Oxyzimtsäureabkömmlinge in Labiaten. *Planta Med.* 27: 372-380
- Logemann E, Parniske M, Hahlbrock K (1995).** Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5905-5909
- Lopukhina A, Dettenberg M, Weiler EW, Holländer-Czytko H (2001).** Cloning und characterization of a corotene-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 1678-1687
- Lozoya E, Hoffmann H, Douglas C, Schulz W, Scheel D, Hahlbrock K (1988).** Primary structures and catalytic properties of isoenzymes encoded by the two 4-coumarate: Co Aligase genes in parsley. *Eur. J. Biochem.* 176: 661-667
- Ly TN, Shimoyamada M, Yamauchi R (2006).** Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth. Leaves and their antioxidative activity. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3786-3793
- Ma X, Koepke J, Panjekar S, Fritzsche G, Stöckigt J (2005).** Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of BAHD superfamily. *J. Biol. Chem.* 280: 13576-13583
- MacDonald MJ, D’Cunha GB (2007).** A modern view of phenylalanine ammonia-lyase. *Biochem. Cell Biol.* 85: 273-282
- Mahesh V, Rakotomalala JJ, Gal LL, Vigne H, de Kochko A, Hamon S, Noirot M, Campa C (2006).** Isolation und genetic mapping of a *Coffea canephora* phenylalanine ammonia-lyase gene (CcPAL1) and its involvement in the accumulation of caffeoyl quinic acids. *Plant Cell Rep.* 25: 986-992
- Makino T, Ono T, Muso E, Yoshida H, Honda G, Sasayama S (2000).** Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15: 1140-1145
- Matsumoto S, Takeuchi A, Hayatsu M, Kondo S (1994).** Molecular cloning of phenylalanine ammonia-lyase cDNA and classification of varieties and cultivars of tea plants (*Camellia sinensis*) using the tea PAL cDNA probe. *Theor. Appl. Genet.* 89: 671-675
- Meinhard EJ (1995).** Identifizierung und Reinigung der Rosmarinsäure-Synthase aus Zellkulturen von *Coleus blumei*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Meinhard J, Petersen M, Alfermann AW (1992).** Purification of hydroxyphenylpyruvate reductase from cell cultures of *Coleus blumei*. *Planta Med.* 1: 598-599
- Mizukami H, Ellis BE (1991).** Rosmarinic acid formation and differential expression of tyrosine aminotransferase isoforms in *Anchusa officinalis* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 10: 321-324
- Montemartini M, Santomé JA, Cazzulo JJ, Nowicki C (1993).** Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 292: 901-906
- Mulder-Krieger TH, Verpoorte R, Baerheim Svendsen A, Scheffer JJC (1988).** Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 13: 85-154
- Murray MG, Thompson WF (1980).** Rapid amplification of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321-4325
- Nagashima S, Okada M, Yoshikawa T.** cDNA encoding 4-coumarate: Co Aligase from suspension cultures of *Scutellaria baicalensis*. Unveröffentlicht.

- Nobécourt P (1937).** Culture en série de tissus végétaux sur milieu artificiel. C. R. Séances Soc. Biol. 205: 521-523
- Ober D, Hartmann T (2000).** Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. Plant Mol. Biol. 44: 445-450
- Ogata A, Tsuruga A, Matsuno M, Mizukami H (2004).** Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures: Activities of rosmarinic acid synthase and the two final cytochrome P450-catalyzed hydroxylations. Plant Biotech. 21: 393-396
- Okada T, Mikage M, Sekita S (2008).** Molecular characterization of the phenylalanine ammonia-lyase from *Ephedra sinica*. Biol. Pharm. Bull. 31: 2194-2199
- Olivier DK, van Wyk BE, van Heerden FR (2008).** The chemotaxonomic and medicinal significance of phenolic acids in *Arctopus* and *Alepidea* (Apiaceae subfamily Saniculoidae). Biochem. Syst. Ecol. 28: 229-253
- Osakabe N, Yasuda A, Natusume M, Yoshikawa T (2004).** Rosmarinic acid inhibits inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. Carcinogenesis 25: 549-557
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Schmeda-Hirschmann G, Burillo J, Codina C (2004).** Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) waste. J Agric. Food Chem. 52: 1890-1897
- Parnham MJ, Kesselring K (1985).** Rosmarinic acid. Drugs of the Future 10: 756-757
- Peake PW, Pussell BA, Martyn P, Timmermans V, Charlesworth JA (1991).** The inhibitory effect of rosmarinic acid on complement involves the C5 convertase. Int. J. Immunopharmac. 13: 853-857
- Pedersen JA (2000).** Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. Biochem. Syst. Ecol. 28: 229-253
- Pei HC, Yang YK, Chen CM, Xiong ZG, Niu JY, Liu ZG, Ye JS, Wang JJ, Chen ZK.** Cloning of a full-length cDNA encoding 4-coumarate coenzyme A ligase (4CL) of *Paulownia*. Unveröffentlicht.
- Petersen M (2003).** Cinnamic acid 4-hydroxylase from cell cultures of the hornwort *Anthoceros agrestis*. Planta 217: 96-101
- Petersen M (1997).** Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. Phytochemistry 45: 1165-1172
- Petersen M (1991).** Purification of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei* Benth. Planta 191: 18-22
- Petersen MS (1991).** Characterization of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei*. Phytochemistry 30: 2877-2881
- Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hücherig S, Janiak V, Kim KH, Sander M, Weitzel C, Wolters S (2009).** Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. Phytochemistry. In press.
- Petersen M, Alfermann AW (1988).** Two new enzymes of rosmarinic acid biosynthesis from cell cultures of *Coleus blumei*: Hydroxyphenylpyruvate reductase and rosmarinic acid synthase. Z. Naturforsch. 43 c: 501-504
- Petersen M, Häusler E, Karwatzki B, Meinhard J (1993).** Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. Planta 189: 10-14
- Petersen M, Häusler E, Meinhard J, Karwatzki B, Gertlowski C (1994).** The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 38: 171-179

- Petersen M, Simmonds MSJ (2003).** Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62: 121-125
- Petersen M, Szabo E, Meinhard J, Karwatzki B, Gertlowski C, Kempin B, Fuß E (1995).** Biosynthesis and accumulation of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 43: 89-92
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975).** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-599
- Porath J, Olin B (1983).** Immobilized Metal Ion Affinity Adsorption and Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography of Biomaterials. Serum Protein Affinities for Gel-Immobilized Iron and Nickel Ions. *Biochemistry* 22: 1621-1630
- Ramachandra Rao S, Ravishankar GA (2002).** Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotech. Adv.* 20: 101-153
- Ravn H, Pedersen MF, Andary J, Borum C, Anthoni U, Christophersen C, Nielsen PH (1994).** Seasonal variation and distribution of two phenolic compounds, rosmarinic acid and caffeic acid, in leaves and roots-rhizomes of eelgrass (*Zostera marina* L.). *Ophelia* 40: 51-61
- Razzaque A, Ellis BE (1977).** Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. *Planta* 137: 287-291
- Ritter H, Schulz GE (2004).** Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Cell* 16: 3426-3436
- Rösler J, Krekel F, Amrhein N, Schmid J (1997).** Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol.* 113: 175-179
- Rogers SO, Bendich AJ (1985).** Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76
- Rose AB, Beliakoff JA (2000).** Intron-mediated enhancement of gene expression independent of unique intron sequences and splicing. *Plant Physiol.* 122: 535-542
- Routien JB, Nickel LG (1952).** Cultivation of Plant Tissue. US Patent 2,747,443
- Rubio B, Diaz AM, Martin T, Zaragoza F, Villaescusa L (1992).** Phenolic compounds in *Scolymus hispanicus* L. *Ars. Pharm.* 33: 462-465
- Russell DW, Conn EE (1967).** The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Archs. Biochem. Biophys.* 122: 256-258
- Sahu A, Rawal N, Pangburn MK (1999).** Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated C3b. *Biochem. Pharmacol.* 57: 1439-1446
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985).** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Sandorf I, Holländer-Czytko H (2002).** Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 173-179
- Satake T, Kamiya K, Saiki Y, Hama T, Fujimoto Y, Kitanaka S, Kimura Y, Uzawa J, Endang H, Umar M (1999).** Studies on the constituents of fruits of *Helicteres isora* L. *Chem. Pharm. Bull.* 47: 1444-1447
- Scarpati ML, Oriente G (1958).** Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus off.*). *Ric. Sci.* 28: 2329-2333

- Schneider K (2005).** Mechanismus der Substratselektion der Adenylat-bildenden Enzyme. Cuvillier Verlag Göttingen.
- Schneider K, Hövel K, Witzel K, Hamberger B, Schomburg D, Kombrink E, Stuible HP (2003).** The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate:CoA ligase. PNAS 100: 8601-8606
- Schwarz S, Spies U, Cardoso M (1991).** Cloning and sequence analysis of a plasmid-encoded chloramphenicol acetyltransferase gene from *Staphylococcus intermedius*. J. Gen. Microbiol. 137: 977-981
- Schwede TF, Retey J, Schulz GE (1999).** Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. Biochemistry 38:5355-5361
- Song J, Wang Z (2009).** Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*SmPAL1*) from *Salvia miltiorrhiza*. Mol. Biol. Rep. 36: 939-952
- Southern EM (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517
- St. Pierre B, De Luca V (2000).** Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. Rec. Adv. Phytochem. 34: 285-316
- Stöckigt J, Zenk MH (1975).** Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives. Z Naturforsch. 30c: 352-358
- Stuible HP, Büttner D, Ehtling J, Hahlbrock K, Kombrink E (2000).** Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes. FEBS Letters 467: 117-122
- Sulkowski E (1985).** Purification of proteins by IMAC. Trends in Biotechnol. 3: 1-7
- Sumaryono W, Proksch P (1993).** *Orthosiphon aristatus* (Java tea): *in vitro* culture and elicitation of rosmarinic acid in cell suspensions. Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry Vol. 24. Medicinal and aromatic plants. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York: 287-299
- Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, Basu A (2007).** Anti-viral und anti-inflammatory effect of rosmarinic acid in an experimental murine model of japanese encephalitis. Antimicrob. Agents Chemother. 51: 3367-3370
- Szabo E, Thelen A, Petersen M (1999).** Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Rep. 18: 485-489
- Takeda R, Hasegawa J, Sinozaki K (1990).** The first isolation of lignans, megacerotonic acid and anthocerotonic acid, from non-vascular plants, Anthocerotae (hornworts). Tetrahedron Lett. 31: 4159-4162
- Timm S, Nunes-Nesi A, Pärnik T, Morgenthal K, Wienkoop S, Keerberg O, Weckwerth W, Kleczkowski LA, Fernie AR, Bauwe H (2008).** A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 20: 2848-2859
- Trute A, Nahrstedt A (1996).** Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods (HPLC, CE, GC) and the determination of rosmarinic acid in *Hedera helix* L. Phytochem. Anal. 7: 204-208
- Veena V, Taylor CG (2007).** *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. In Vitro Cell. Dev. Biol. 43: 383-403
- Velazquez Fiz MP, Diaz Lanza AM, Fernandez Matellano L (2000).** Polyphenolic compounds from *Plantago lagopus* L. Z. Naturforsch. 55c: 877-880

- Vetter E (1988).** Biosynthese der Rosmarinsäure – Enzymatische Untersuchung zur Biosynthese der „Zimtsäure“-CoA-Ester bei Suspensionskulturen von *Coleus blumei*. Diplomarbeit, Tübingen, FRG
- Vogelsang K, Schneider B, Petersen M (2005).** Production of rosmarinic acid and a new rosmarinic acid 3'-O- β -D-glucoside in suspension cultures of the hornwort *Anthoceros agrestis* Paton. *Planta* 223: 369-373
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000).** Cytochrome P450: a success story. *Gen. Biol.* 1: 3003.1-3003.9
- White PR (1939).** Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. *Am. J. Bot.* 26: 59-64
- Wichtl M (2008).** Teedrogen und Phytopharmaka, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Wolf HT, van den Berg T, Czygan FC, Mosandl A, Winckler T, Zündorf I, Dingermann T (1999).** Identification of *Melissa officinalis* subspecies by DNA fingerprinting. *Planta Med.* 65: 83-85
- Xu F, Cai R, Cheng S, Du H, Wang Y, Cheng S (2008).** Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba*. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 721-729
- Yazaki K, Heide L, Tabata M (1991).** Formation of p-hydroxybenzoic acid from p-coumaric acid by cell free extract of *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Phytochemistry* 30: 2233-2236
- Yazaki K, Ogawa A, Tabata M (1995).** Isolation and characterization of two cDNAs encoding 4-coumarate:CoA ligase in *Lithospermum* cell cultures. *Plant Cell Physiol.* 36: 1319-1329
- Yoshida M, Fuchigarni , Nagao T, Okabe H, Matsunaga K, Takata J, Karube Y, Tsuchihashi R, Kinjio J, Fujioka T (2005).** Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from *Centella asiatica*. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 173-175
- Youn J, Lee KH, Won J, Huh SJ, Yun HS, Cho WG, Paik DJ (2003).** Benefical effects of rosmarinic acid on suppression of collagen induced arthritis. *J. Rheumatol.* 30: 1203-1207
- Yukimune Y, Hara Y, Yamada Y (1994).** Tropane alkaloid production in root cultures of *Duboisia myoporoides* obtained by repeated selection. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1443-1446
- Yun YS, Satake M, Katsuki S, Kunugi A (2004).** Phenylpropanoid derivatives from edible canna, *Canna edulis*. *Phytochemistry* 65: 2167-2171
- Zhang J (2003).** Evolution of gene duplication: an update. *Trends Ecol. Evolut.* 18: 292-298
- Zhang XH, Chiang VL (1997).** Molecular cloning of 4-coumarate: coenzyme A ligase in loblolly pine and the roles of this enzyme in the biosynthesis of lignin in compression wood. *Plant Physiol.* 113: 65-74
- Zhao SJ, Hu ZB, Liu D; Leung FCC (2006).** Two divergent members of 4-coumarate:coenzyme A ligase from *Salvia miltiorrhiza* Bunge: cDNA cloning and functional study. *J. Integrat. Plant Biol.* 48: 1355-1364
- Zhou MY, Gomez-Sanchez CE (2000).** Universal TA Cloning. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2:1-7
- Zhu I, Li Y, Yang J, Zuo I, Zhang D (2008).** Studies on chemical constituents of *Sarcandra glabra*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 33: 155-157

8 Anhang

8.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

8.1.1 Chemikalien

(N)-Lauroyl-Sarcosin, Na-Salz	Sigma
1,4-Dithiothreitol	Serva
2-Oxoglutarat, Na-Salz	Merck
2,4-D	
4-Cumarsäure	Alfa Aesar
Aceton	Roth
Acetonitril	Roth
Acrylamid: rotiphoese Gel 30	Roth
Adenosin 5'-Monophosphat	Sigma
Adenosin 5'-Triphosphat, Na-Salz	Biomol
Agarose	Biozym
Agarose NEE0, Ultra Qualität	Roth
Aktivkohle	Merck
Ameisensäure 98-100%	Merck
Ammoniak 25 %	Riedel-de-Haen
Ammoniumacetat p.a.	Merck
Ammoniumnitrat p.a.	Roth
Ammoniumsulfat	Roth
Ammoniumsulfat p.a.	Merck
Ampicillin, Na-Salz	Roth
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments	Roche
APS	
Ascorbinsäure L(+), Na-Salz	Roth
Blocking-Reagent	Roche
Borsäure p.a.	Merck
Borsäure p.a.	Roth
Butanol, tert.	Merck
Calciumchlorid-2-hydrat p.a.	Merck
Chinasäure (-)	Roth
Chloroform	Roth
Chlorogensäure (Hemihydrat)	Fluka
Coenzym A-Trilithium-Salz	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue G250	Fluka
CSPD	Roche
CTAB	Roth
DHPP	Sigma
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat	Duchefa

Di-Natriumtetraborat	Merck
EDTA, Na-Salz	Roth
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	Fluka
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	Roth
Essigsäure p.a.	Roth
Ethanol p.a.	Roth
Ethidiumbromid-Lösung 1 %	AppliChem
Ethidiumbromide Solution	Fluka
Ethylacetat	Roth
Ferulasäure	
Glycerin	Roth
Glycin	
Guanidinthiocyanat	Roth
Hefeextrakt	Roth
IES	
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
Kaffeesäure	Alfa Aesar
Kaliumacetat	
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumjodid	
Kaliumnitrat	Roth
Kinetin	
Kobalt(II)chlorid	Merck
Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat	Fluka
L-Phenylalanin	Roth
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth
Maleinsäure	Sigma
Mangan(II)sulfat	Duchefa
Methanol	Fisher Scientific
myo-Inositol	Merck
n-Butanol	Roth
N,N-Dimethylformamid	Merck
NAA	Duchefa
NADH	Biomol
NADPH, Na-Salz	Roth
Natriumacetat-Trihydrat p.a.	Roth
Natriumcarbonat p.a.	Fluka
Natriumchlorid p.a.	Roth
Natriumcitrat	
Natriumdihydrogenphosphat	Duchefa
Natriumhydroxid p.a.	Roth
Natriummolybdat-Dihydrat	
Nickel(II)sulfat-Heptahydrat	Roth
Nicotinsäure	Duchefa
NZ-Amine A	Sigma
PD-Säulchen	GE Healthcare
<i>o</i> -Phosphorsäure, 85 %	
Phenol, Citrat-Puffer gesättigt	Sigma
pHPL, approx. 98 %	Sigma
pHPP	Sigma
Polyvinylpyrrolidon	
Pyridoxalphosphat	

Pyridoxin-HCl	Duchefa
Rhozyme HP 150	
RNase A	
Rosmarinsäure	
Roti-Load 1, 4 x Konz.	Roth
Saccharose	
SDS	Roth
Seesand, reinst	Roth
Shikimisäure	Roth
TEMED p.a.	Roth
Thiamindichlorid	
Trichloressigsäure	
Tris	Roth
Trypton/Pepton	Roth
Tween 20 pure	Serva
X-β-Gal	Roth
Zimtsäure p.a.	Duchefa
Zinksulfat-Heptahydrat p.a.	Duchefa

8.1.2 Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

<i>Bam</i> HI	Fermentas
<i>Bcl</i> I	
<i>Bgl</i> II	
<i>Cfr</i> 421 (<i>Sac</i> II)	
<i>Dra</i> I	
<i>Eco</i> RI	
<i>Eco</i> RV	
<i>Nco</i> I	
<i>Nde</i> I	
<i>Pst</i> I	
<i>Xho</i> I	

8.1.3 Vektoren und Kits

GeneRacer Core Kit	Invitrogen
GeneRacer SuperScript III RT Module	Invitrogen
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega
High Fidelity PCR Enzyme Mix	Fermentas
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
pET15b	Novagen
pGEM-T® Vector System I	Promega
pQE70 (C-Terminus pQE Vector Set)	QIAGEN
pRSET A, B & C	Invitrogen
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
Roti-Transform	Roth

8.1.4 Geräte

Autoklav	Systec VX-150 Advantage-Lab AL02-02-100	Systec GmbH Labor-Systemtechnik
Bakterienschüttler		Gallenkamp
Flachbrettscanner	ScanJet 3400C	Hewlett Packard
Gefriertrockner	Christ L1	B. Braun Biotech.
Geldokumentationssystem		RS-Laborgeräte
HPLC	SpectroMonitor 3200 L-6000 Pump D-2500 Chromato-Integrator	LDC analytical Merck-Hitachi Merck-Hitachi
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instr.
PCR-Cycler	Master Cycler Gradient My Cycler thermal cycler	Eppendorf BioRad
pH-Elektrode	Accumed Basic	Fisher Scientific
Photometer	Eppendorf BioPhotometer 930 Spectrometer	Eppendorf Uvikon
Rotationsverdampfer	Rotovapor RE 120	Büchi
Schlagmesserhomogenisator	Ultra Turrax T25 Basic	IKA
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin
Ultraschallprozessor	UP 200S	Dr. Hielscher
UV-Lampe		Bachofer GmbH
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Instruments
Waagen	PT 310 Analysenwaage EG 300-3M Analysenwaage H64	Sartorius Kern Mettler
Zentrifugen	Centrifuge 5415D Sigma 3K30 Biofuge 17RS	Eppendorf B. Braun Biotech. Heraeus Sepatech

8.2 Abkürzungen

8.2.1 Abkürzungen im Text

% (V/V)	Volumenprozent
% (W/V)	Gewichtsprozent
3-H	Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllactat 3-Hydroxylase
3'-H	Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllactat 3'-Hydroxylase
4C-CoA	4-Cumaroyl-CoA
4CL	Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
:B	angreifende Base
BBP	Borsäure/Borax-Puffer
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BRE	bakterielles Proteinrohextrakt
BSA	bovine serum albumin = Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C3H	4-Cumarat 3-Hydroxylase
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
CaffCoA	Caffeoyl-CoA
CCoAOMT	Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase
CCR	CInnamoyl-CoA Reduktase
cDNA	copy DNA
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CoA	Coenzym A
CPR	NADPH:Cytochrom P450 Reduktase
CYP450	Cytochrom P450-Enzyme
d	Schichtdicke der Küvette
D	Durchfluss
dest.	destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHPL	3,4-Dihydroxyphenyllactat
DHPP	3,4-Dihydroxyphenylpyruvat
DIECA	Natriumdiethyldithiocarbamat
D-LDH	D-Lactat Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Extinktion
E1/2/3	1./2./3. Elutionsfraktion
EC	Enzyme commission number = numerisches Klassifikationssystem für Enzyme
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMN	Flavin-Mononucleotid
g	Gramm
g	Relative Zentrifugationsbeschleunigung
GTC	Guanidinthiocyanat
HAL	Histidin Ammoniak-Lyase
HCS/QT	Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat/Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase
HCT	Hydroxycinnamoyltransferase
HPLC	High performance liquid chromatography = Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPPR	Hydroxyphenylpyruvat Reduktase
HPR	Hydroxyphenylpyruvat Reduktase
HST	Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase

HW	Linearisierung nach der Methode von Hanes-Woolf
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Jh.	Jahrhundert
Kap.	Kapitel
kat	Katal = mol/s
kDA	Kilodalton
KP = KPi	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer
l	Liter
L.	Linné
LB	Linearisierung nach der Methode von Lineweaver-Burk
Lys-Enz	an ein Enzym gebundenes Lysin
M	mol/l
m	Meter
MeJa	Methyljasmonat
min	Minute(n)
min.	mindestens
MIO	4-Methyliden-imidazol-5-on
mRNA	messenger RNA
MS	Mikrosomensuspension
N	Normal
n.a.	nicht angegeben
NaB	Natriumborat-Puffer
NAD ⁺	Nicotinamid Adenin Dinucleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid, reduzierte Form
NADP ⁺	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat, reduzierte Form
n.b.	nicht bestimmbar
n. Chr.	nach Christi Geburt
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi = für die Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin Ammoniak-Lyase
pCCoA	4-Cumaroyl-CoA
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
pHPL	4-Hydroxyphenyllactat
pHPP	4-Hydroxyphenylpyruvat
PLP	Pyridoxalphosphat
PMP	Pyridoxaminphosphat
RACE	rapid amplification of cDNA-ends
RAS	Rosmarinsäure Synthase
RE	Proteinrohextrakt
RNA	Ribonucleinsäure
RNasen	Ribonucleasen
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde(n)
s	Menge der Nucleotide der Sequenz
S	Sievert
SDS	sodium dodecyl sulphate = Natriumlaurylsulfat
ssp.	subspecies = Unterart
t	Messzeit
Tab.	Tabelle
TAP	tobacco acid pyrophosphatase
TAT	Tyrosin Aminotransferase
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TYR	L-Tyrosin
U	Unit = Einheit
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

V	Volumen
v. Chr.	vor Christi Geburt
W1/2/3	1./2./3. Waschfraktion
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactosid
z.B.	zum Beispiel
ϵ	Extinktionskoeffizient

8.2.2 Abkürzungen der Aminosäuren und Nukleotide

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

Nukleotid	Einbuchstabencode
Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Uracil	U

8.3 Vektorkarten

8.3.1 pGEM®-T Vektor

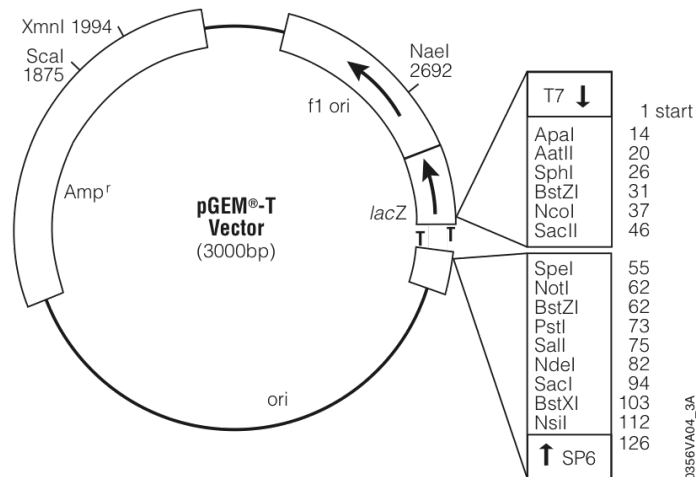


Abb. 149: Klonierungvektor pGEM®-T (Promega)

8.3.2 pRSET C Vektor

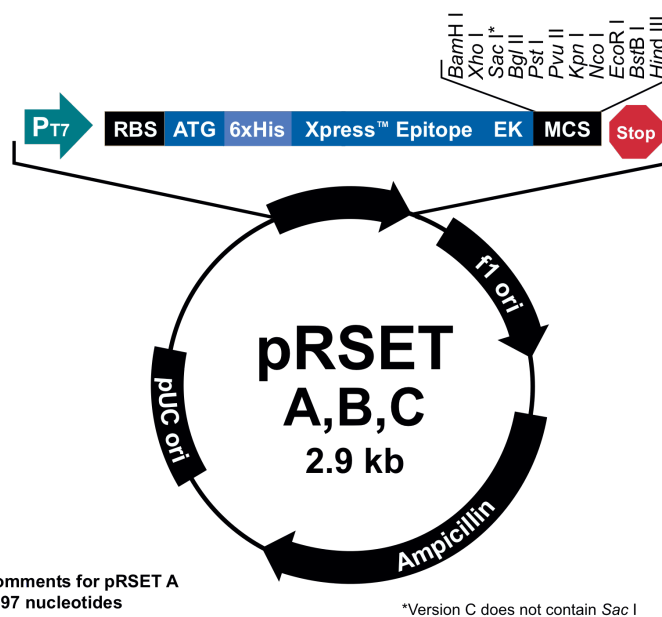


Abb. 150: Expressionsvektor pRSET (Invitrogen)

T7 promoter
 21 AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTTCCTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA RBS

Polyhistidine (6xHis) region
 91 GATATACAT **ATG** CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
 Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

T7 gene 10 leader Xpress™ Epitope BamH I
 148 GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG ATC
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Arg Trp Ile
 EK recognition site EK cleavage site

Xho I Bgl II Pst I Pvu II Kpn I Nco I EcoR I BstB I Hind III
 205 CGA CCT CGA GAT CTG CAG CTG GTA CCA TGG AAT TCG AAG CTT GAT CCG GCT GCT AAC
 Arg Pro Arg Asp Leu Gln Leu Val Pro Trp Asn Ser Lys Leu Asp Pro Ala Ala Asn

T7 reverse priming site
 262 AAA GCC CGA AAG GAA GCT GAG TTG GCT GCT GCC ACC GCT GAG CAA TAA CTA GCA
 Lys Ala Arg Lys Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Gln Gln ***

Abb. 151: Multiple Cloning Site des Vektors pRSET C (Invitrogen)

8.3.3 pET-15b Vektor

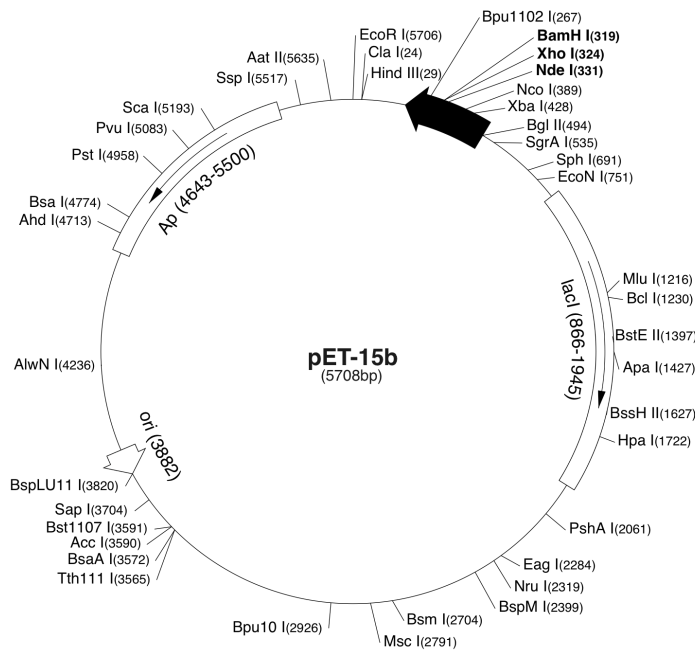


Abb. 152: Expressionsvektor pET-15b

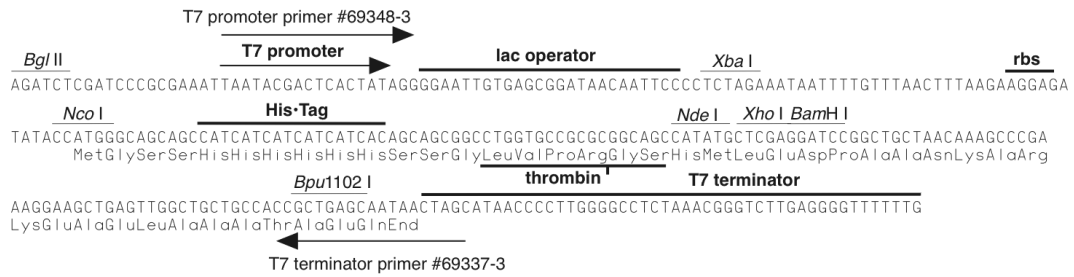


Abb. 153: Multiple Cloning Site des Vektors pET-15b

8.3.4 pQE70 Vektor

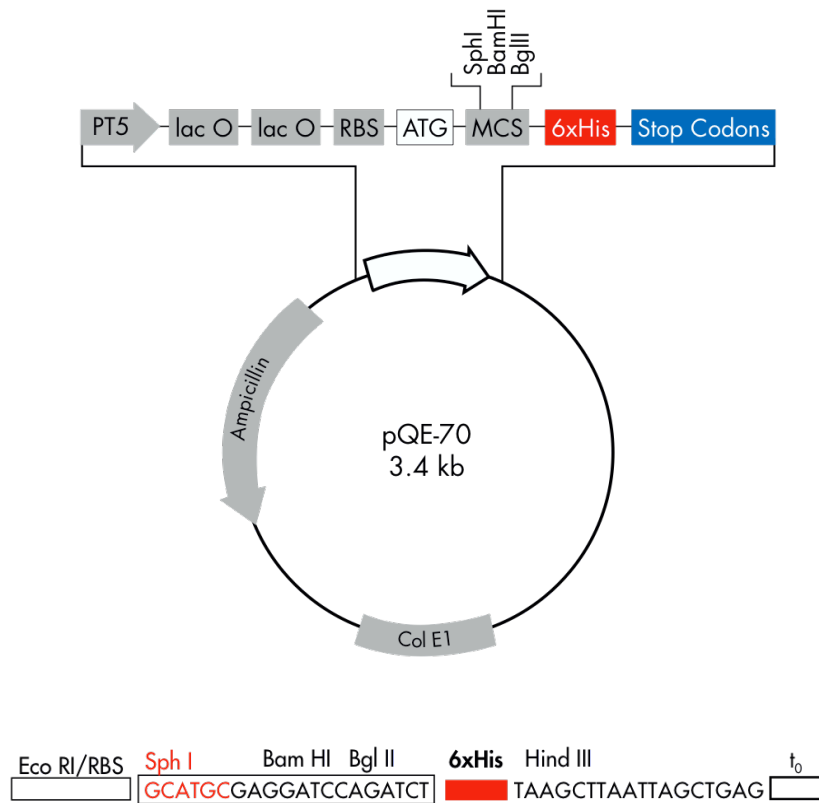


Abb. 154: Expressionsvektor pQE70 und Sequenz der Multiple Cloning Site (QIAGEN)

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Weitzel C, Petersen M (2007). Characterisation of rosmarinic acid biosynthesis in cell cultures of *Melissa officinalis* (Lamiaceae). Posterbeitrag. 125 Years Deutsche Botanische Gesellschaft. Botanikertagung Hamburg. (Poster)

Weitzel C, Petersen M (2008). Rosmarinic acid biosynthesis: Investigations of enzyme activities and genes in cell cultures of *Melissa officinalis*. *Planta Medica* 74:1162 (Poster und Kurzpublikation)

Weitzel C, Petersen M (2008). Rosmarinic acid biosynthesis in cell cultures of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). PSE Young Scientists' Meeting. Future Trends in Phytochemistry: Compounds – Enzymes – Genes. „Haus der Kirche“, Bad Herrenalb. (Vortrag)

Weitzel C, Petersen M (2009). Untersuchungen zu Enzymen der Rosmarinsäure-Biosynthese in Zellkulturen von *Melissa officinalis* (Lamiaceae). 6. Treffen der Sektion „Pflanzliche Naturstoffe“ der Deutschen Botanischen Gesellschaft. Bonifatiushaus, Fulda. (Vortrag)

Weitzel C, Petersen M (2009). Rosmarinic Acid Biosynthesis in *Melissa officinalis* L. Botanikertagung Leipzig. (Poster)

Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hücherig S, Janiak V, Kim KH, Sander M, Weitzel C, Wolters S (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70: 1663-1679

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zuerst bei Frau Professor Maike Petersen, die mir dieses interessante Thema überlassen hat und mir jederzeit bei Fragen und Problemen hilfreich zur Seite stand.

Außerdem danke ich allen meinen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Pharmazeutische Biologie für die gute Zusammenarbeit, die vielen hilfreichen Tipps, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit, die wir gemeinsam im Labor, im Praktikum und in und um Marburg verbracht haben.

Mein besonderer Dank gilt Stephanie Hücherig, mit der ich gemeinsam von Beginn der Arbeit bis über ihr Ende hinaus arbeiten durfte und die mir nicht nur geduldig so viele Arbeitstechniken erklärt hat, sondern die von Anfang an mehr als eine Kollegin war.

Der größte Dank gilt allerdings meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Freund, meinen Großeltern und unserer Gote, die nicht nur die Erfolge in Studium und Labor mitgefeiert haben, sondern auch bereit waren, bei Misserfolgen und Problemen immer wieder gemeinsam mit mir nach Lösungen zu suchen. Ihr habt immer an das Gelingen dieser Arbeit geglaubt. Danke, für Eure Geduld und Hilfe!

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Rosmarinsäure-Biosynthese in
Suspensionskulturen von *Melissa officinalis* L.“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 14.10.2009

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Corinna Weitzel
Geburtsdatum: 27.05.1981
Geburtsort: Marburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1987-1991 Nordschule, Grundschule I, Stadtallendorf
1991-2000 Stiftsschule St. Johann, Amöneburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

2000-2004 Pharmaziestudium an der Philipps-Universität Marburg
08/2003-12/2003 Auslandssemester an der Universität Kuopio, Finnland
2005 Abschluss: 3. Staatsexamen und
2006 Approbation als Apothekerin
03/2006-11/2009 Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie
an der Philipps-Universität Marburg

Praktika und Berufspraxis:

02/2001 Famulatur in der Markt-Apotheke in Stadtallendorf
08-09/2001 Famulatur in der Krankenhausapotheke der Universitäts-
klinik Marburg
03/2002 Famulatur in der Apotheke H. Jung, Kirchhain
09-10/2002;
03-07/2003 Aushilfstätigkeit in der Apotheke H. Jung, Kirchhain
11/2004-04/2005 Praktikum bei Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
05/2005-10/2005 Praktikum in der Alten Apotheke in Neustadt/Hessen
seit 12/2005 Arbeit und Nebentätigkeit als Apothekerin in der Alten
Apotheke in Neustadt/Hessen